

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Infeção *trans* de microglia e astrócitos por estirpes primárias de HIV-1 e HIV-2

Ana Catarina Costa Lopes

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Infeção *trans* de microglia e astrócitos por estirpes primárias de HIV-1 e HIV-2

Ana Catarina Costa Lopes

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Orientador: Doutor José Miguel Azevedo Pereira, Professor Auxiliar com Agregação

Coorientadora: Marta Calado, Mestre

2019

Resumo

Atualmente, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) continua a ser um problema de saúde pública que, apesar de constantes avanços terapêuticos, ainda afeta muitos indivíduos devido às comorbilidades associadas. Uma das comorbilidades que beneficiou com as novas terapêuticas foi o *AIDS dementia complex* (ADC, demência associado à SIDA) que passou a existir numa forma menos grave, designada por *minor cognitive motor disorder* (MCMD). No entanto, esta síndrome continua a afetar física, psicológica e socialmente muitos indivíduos infectados.

As maiores dificuldades em compreender as comorbilidades em que ocorre degeneração neuronal associada ao HIV prendem-se com o pouco conhecimento existente em relação ao modo como o vírus entra no parênquima cerebral e como infeta as células do Sistema Nervoso Central (SNC). Os principais alvos do vírus no SNC parecem ser os macrófagos perivasculares e as células de micróglia, seguido dos astrócitos, não se conhecendo ainda com muito detalhe os mecanismos implicados na sua infeção. Alguns estudos indicam também que estas células podem ser consideradas reservatórios virais por permitirem a integração do genoma viral no genoma celular e, em estadios mais avançados da infeção, permitirem a propagação da mesma dentro do SNC.

Com a realização deste projeto pretendíamos esclarecer quais seriam as melhores condições para que ocorresse a propagação do vírus nas principais células-alvo do SNC, bem como perceber se estas poderiam funcionar como reservatórios virais. Para isso, fomos verificar como se processava a disseminação da infeção das células do sangue (linfócitos T CD4+ e macrófagos) para as células do SNC (micróglia e astrócitos), tendo esta ocorrido quando as co-culturas permitiram um contato célula-célula mas também quando existia uma barreira física a separar as células-dadoras das células-alvo. No entanto, não ocorreu disseminação da infeção quando as células do SNC foram infectadas em *cis* pela estirpe HIV-1^{UCFL1032}.

Nas culturas em que não detetámos replicação viral, averiguámos se teria ocorrido integração do genoma viral para compreender se estaríamos perante reservatórios virais, tendo apenas ocorrido em células de micróglia, mas não em astrócitos.

Palavras-chave

Infeção *trans*; micróglia; astrócitos; linfócitos T CD4+; HIV

Abstract

The human immunodeficiency virus (HIV) remains a public health problem that despite constant therapeutic advances, still affects many individuals due to associated comorbidities. One of the comorbidities that benefited from the new therapies was AIDS dementia complex (ADC), that became less severe in a form called minor cognitive motor disorder (MCMD). However, this syndrome continues to affect many infected individuals either socially, physically or psychologically.

The greatest difficulty in understanding HIV-associated neuronal degeneration is due to the lack of knowledge about how the virus enters the brain parenchyma and how it infects central nervous system (CNS) cells. The main targets in the CNS appear to be perivascular macrophages and microglia cells, followed by astrocytes, but the mechanisms involved in its infection are not yet fully known. Some studies also indicate that these cells can be considered viral reservoirs because they allow the integration of the viral genome into the cellular genome and, in later stages of infection, allow its spread within the CNS.

Our main goal was to clarify what would be the best conditions for the virus to spread into CNS cells, as well as to understand if they could function as viral reservoirs. To this end, we looked at how the spread of blood cell infection (CD4 + T lymphocytes and macrophages) to the CNS cells (microglia and astrocytes) was processed. It occurred when the co-culture allowed cell-to-cell contact and when there was a physical barrier separating donor cells from target cells. However, infection did not spread when CNS cells were cis-infected by the HIV-1_{UCFL1032} strain.

In cultures where we did not detect viral replication, we investigated whether viral genome integration would have occurred to understand if we were facing viral reservoirs. We obtained positive results for microglia cells but not for astrocytes.

Keywords

Trans infection; microglia; astrocytes; TCD4+ lymphocytes; HIV

Agradecimentos

Ao longo deste trabalho de campo, existiram pessoas fundamentais que permitiram a sua realização da melhor maneira possível, permitindo que eu escrevesse esta tese com alguma sanidade mental restante.

O primeiro agradecimento vai para o Prof. Dr. José Miguel Azevedo Pereira, por ter aceite ser meu orientador nesta aventura, depois de já o ter feito na unidade curricular de Projeto I, e nunca se ter recusado a ajudar e a partilhar o seu conhecimento sempre que foi necessário.

Em segundo lugar, à incansável Mestre Marta Calado, que também é Ana como eu, mas não quer que ninguém saiba. Por todos os comentários e sugestões em que me quiseste estrafegar e esfanicar com muito amor e carinho e por todas as manhãs em que aturaste as minhas crises existenciais e me ajudaste a construir aos bocadinhos esta que será a tua primeira tese como coorientadora. Obrigada por todos os momentos incríveis no laboratório, sei que vou ter muitas saudades! E também tenho a certeza de que mais momentos incríveis estão por vir, mas desta vez fora do laboratório, porque sei que ganhei uma amiga. Uma amiga com quem partilho as coisas mais pequeninas, mas que partilha de volta com o mesmo sentido, e não podia pedir melhor. Obrigada de coração! E prometo que te dou o abraço que mereces, mesmo que não gostes de abraços!

Tenho também de agradecer à minha família por me ter incentivado a procurar oportunidades e a aprender constantemente. Pedir desculpa aos manos mais pequeninos por todas as tardes em que lhes disse que não podia ficar a jogar Monopólio e que saí de casa deles com um aperto no coração por saber que ficavam a chorar. E, no fundo, a todos os familiares a quem disse “Não posso, tenho de ir escrever a tese” porque foram mais vezes do que as que gostaria, mas sei que no fundo sempre compreenderam.

Um dos agradecimentos mais importantes tem de ser para o rapaz que me atura todos os dias e que mais sofreu com a ausência de respostas quando estava a escrever a tese. Sei que, sem o apoio e constante incentivo dele, não conseguiria fazer metade das coisas que fiz durante todo este tempo. Estes 5 anos provaram o quanto somos flexíveis e capazes de lidar com o que quer que nos apareça pelo caminho, e estou mesmo orgulhosa de nós. E, embora saiba que ele odeia manifestações públicas de carinho, sei que não conseguiria chegar aqui da mesma maneira sem ele. Não posso estar mais grata por ter alguém assim ao meu lado. Obrigada por não me deixares chorar sozinha, mas principalmente por rires comigo e me fazeres incrivelmente feliz!

Não posso esquecer-me de agradecer à minha Carol. Companheira de tantas horas de estudo, de laboratórios pouco seguros para a saúde e de aventuras sem fim pelos corredores da faculdade. Obrigada por seres a minha maior e melhor fonte de gossip e por seres tão má pessoa quanto eu! Mas obrigada por seres a amiga incrível que és, por me surpreenderes sempre em momentos em que não sonho sequer que irás estar e por me motivares a nunca desistir quando essa é a minha única vontade. Obrigada por aturares todos os giveaways em

que te identifico e por seres a única amiga com quem quero estar mais de 2 horas ao telemóvel! És a prova viva que os amigos da faculdade são para sempre!

Um agradecimento especial à minha Xana, uma amiga incrível que acabou por vir completar a família da faculdade. Obrigada por todo o incentivo, desde as coisas pequenas às maiores. És uma força da natureza e sei que posso contar contigo para tudo, incluindo lanches na Padaria Portuguesa em cima da hora! Obrigada por te teres tornado uma presença constante na minha vida!

Às meninas que completam a grupeta, Inês Pésinho, Cátia Damião e Marta Samora, obrigada por serem contributos tão diferentes para a minha vida! Cada uma de vocês é uma voz da razão a puxar para lados diferentes, mas complementam em muito a minha falta de razão. Que a vida não separe aquilo que Farmácia juntou!

Aos meus amigos do básico, que para mim são os amigos de sempre, obrigada por se terem tornado verdadeiros amigos! Sei que posso contar com o vosso incentivo sempre que algo não corre bem e que estão cá para festejar comigo todos os sucessos. Que venham mais noites de copos!

Índice Geral

Resumo	2
Palavras-chave.....	2
Abstract	3
Keywords.....	3
Agradecimentos	4
Índice Geral	6
Índice de Figuras.....	7
Acrónimos/Abreviaturas	8
1. Introdução	11
1.1. Vírus da imunodeficiência humana.....	11
1.1.2. Organização Estrutural	12
1.1.3. Organização Genómica	13
1.1.4. Ciclo Replicativo	15
1.1.5. Infeção CD4 ⁺ - Independente.....	18
1.1.6. Células Envolvidas na Patogénese do HIV	18
1.1.7. Células Sanguíneas.....	19
1.1.7.1. Linfócitos T CD4 ⁺	19
1.1.7.2. Monócitos/Macrófagos	19
1.1.7.3. Células Dendríticas	20
1.1.8. Infeção do SNC.....	20
1.1.8.1. Micróglia.....	23
1.1.8.2. Astrócitos	24
1.1.8.3. Oligodendrócitos.....	25
1.1.8.4. Neurónios.....	25
2. Objetivos	27
3. Materiais e Métodos.....	28
3.1. Vírus.....	28
3.2. Células	28
3.3. Ensaio de infecciosidade	29
3.3.1. Quantificação da atividade da RT	30
3.3.2. Extração de DNA	30
4. Resultados	33
4.1. Ensaio de infecciosidade	33
4.1.1. Células dadoras: linfócitos T CD4 ⁺	33
4.1.3. Células dadoras: MDM.....	35

4.2. Amplificação da região genómica LTR de HIV-1	35
5. Discussão.....	38
6. Conclusão	40
7. Referências Bibliográficas	42

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do HIV-1.....	13
Figura 2 - Representação esquemática do genoma de HIV-1 e HIV-2.	14
Figura 3 - Ciclo replicativo do HIV.	17
Figura 4 - Entrada do HIV no SNC.	23
Figura 5 - Representação esquemática dos ensaios de infecciosidade.....	29
Figura 6 - Infeção <i>trans</i> de micróglia e astrócitos por linfócitos T CD4+ infetados, nas condições de mixed culture e transwell co-culture.....	33
Figura 7 - Infeção <i>trans</i> de micróglia e astrócitos por linfócitos T CD4+ infetados, nas condições de mixed culture e transwell co-culture.....	34
Figura 8 - Infeção <i>trans</i> de micróglia e astrócitos por linfócitos T CD4+ infetados, nas condições de mixed culture e transwell co-culture, com separação das diferentes populações celulares 42 horas após a infeção.	34
Figura 9 - Infeção <i>trans</i> de micróglia e astrócitos por linfócitos T CD4+ infetados, nas condições de mixed culture e transwell co-culture, com separação das diferentes populações celulares 42 horas após a infeção.	35
Figura 10 - Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 391 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de CHME-3 infetadas pela estirpe HIV-1 _{UCFL1032}	36
Figura 11 - Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 391 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de SGV-mm infetados pela estirpe HIV-1 _{UCFL1032}	37

Acrónimos/Abreviaturas

µg	micrograma
µL	microlitro
°C	grau Celsius
3TC	lamivudina
ADC	demência associada à SIDA, do inglês <i>AIDS dementia complex</i>
ALP	fosfatase alcalina, do inglês <i>alkaline phosphatase</i>
APC	célula apresentadora de antígeno, do inglês <i>antigen presenting cell</i>
AZT	azitomidina
BHE	barreira hematoencefálica
BrdUTP	5-bromo-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato
CA	proteína da cápside, do inglês <i>capsid protein</i>
cART	terapêutica antirretroviral combinada, do inglês <i>Combination Antiretroviral Therapy</i>
CCR5	receptor de β-quimiocinas da classe CC, do inglês CC chemokine receptor 5
cDNA	DNA complementar, do inglês <i>complementary DNA</i>
CMSP	células mononucleadas do sangue periférico
CO ₂	dióxido de carbono
CXCR4	receptor de β-quimiocinas da classe CXC, do inglês CXC chemokine receptor 4
ddC	zalcitabina, do inglês <i>dideoxycytidine</i>
ddl	didanosina
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
<i>env</i>	gene codificante das glicoproteínas do invólucro do HIV, do inglês <i>envelope</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drugs Administration</i>
<i>gag</i>	gene codificante das proteínas da estrutura interna do HIV, do inglês <i>group specific antigen</i>
gp	glicoproteína
HAART	terapêutica antirretroviral de alta eficácia, do inglês <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HTLV-III	Vírus T-linfotrópico Humano Tipo III, do inglês <i>Human T-lymphotropic Virus</i>
IL-1β	interleucina 1β, do inglês <i>interleukin 1β</i>

IL-2	interleucina 2, do inglês <i>interleukin 2</i>
IN	integrase
INI	inibidor da integrase, do inglês <i>integrase inhibitor</i>
LAV	Vírus Associado a Linfadenopatias, do inglês <i>Lymphadenopathy-Associated Virus</i>
LTR	repetições terminais longas, do inglês <i>Long Terminal Repeat</i>
MA	proteína da matriz, do inglês <i>matrix protein</i>
MCMD	do inglês <i>Minor Cognitive Motor Disorder</i>
mg	miligrama
MHC	complexo major de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro, do inglês <i>messenger RNA</i>
NC	proteína da nucleocápside, do inglês <i>nucleocapsid protein</i>
<i>nef</i>	gene acessório do HIV, do inglês <i>negative factor</i>
ng	nanograma
nm	nanómetro
NNRTI	inibidor da transcriptase reversa análogo de não nucleósidos, do inglês <i>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
NRTI	inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleósidos, do inglês <i>Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
PBS	tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pen/Strep	penicilina/estreptomicina
PHA	fitohemaglutinina, do inglês <i>phytohaemagglutinin</i>
PI	inibidor da protease, do inglês <i>protease inhibitor</i>
<i>pol</i>	gene codificante das proteínas de natureza enzimática do HIV, do inglês <i>polymerase</i>
PR	protease
<i>rev</i>	gene regulador do HIV, do inglês <i>regulator of expression of viral proteins</i>
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>

RNaseH	ribonuclease H
RT	transcriptase reversa, do inglês <i>reverse transcriptase</i>
SBF	soro bovino fetal
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIV	vírus da imunodeficiência símia, do inglês <i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SNC	sistema nervoso central
SU	glicoproteína de superfície, do inglês <i>surface protein</i>
<i>tat</i>	gene regulador do HIV, do inglês <i>transactivator of gene expression</i>
TCR	complexo recetor das células T, do inglês <i>T complex receptor</i>
TM	proteína transmembranar, do inglês <i>transmembrane protein</i>
UI	unidade internacional
UK	Reino Unido, do inglês <i>United Kingdom</i>
USA	Estados Unidos da América, do inglês <i>United States of America</i>
<i>vif</i>	gene acessório do HIV, do inglês <i>viral infectivity factor</i>
<i>vpr</i>	gene acessório do HIV, do inglês <i>viral protein R</i>
<i>vpu</i>	gene acessório do HIV-1, do inglês <i>viral protein U</i>
<i>vpx</i>	gene acessório do HIV-2, do inglês <i>viral protein X</i>
ZDV	zidovudina

1. Introdução

1.1. Vírus da imunodeficiência humana

As primeiras descrições da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foram feitas em 1981 nos Estados Unidos da América, com o aumento do número de homens homossexuais, jovens e saudáveis, a registar a presença de infeções oportunistas e doenças raras (1,2). Seguiram-se relatos semelhantes, com o aparecimento de imunodeficiências acentuadas em outros grupos, nomeadamente pessoas heterossexuais, com historial de uso de drogas injetáveis, recentemente sujeitas a transfusões sanguíneas ou doentes hemofílicos (3,4).

O isolamento do vírus que causa a SIDA foi conseguido em 1983 e 1984 por dois grupos de trabalho diferentes. A equipa de Luc Montaigner atribui o nome de *Human T-lymphotropic Virus Type III* (HTLV-III) (5) e a equipa de Robert Gallo denominou o vírus de *Lymphadenopathy Associated Virus* (LAV) (6). Em 1986, um comité internacional recomendou a alteração do termo para *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (7). Nesse mesmo ano foi identificado um segundo agente etiológico, também retrovírus, com características semelhantes ao HIV-1, denominado HIV-2 (8).

Alguns anos após a descoberta deste vírus, foram iniciados esforços para se encontrar uma terapêutica que permitisse um melhor controlo do vírus, sendo em 1987 aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) o uso de azitomidina (AZT), mais tarde designada por zidovudina (ZDV), para controlo da infeção avançada em doentes com HIV (9). No entanto, esta terapêutica tinha vários efeitos secundários e o seu benefício não tinha uma duração adequada às necessidades destes doentes. Pouco tempo depois foram aprovados mais três inibidores *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors* (NRTIs, inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleósidos), a zalcitabina (ddC), a didanosina (ddl) e a estavudina (d4T). Estes fármacos também apresentavam alguma toxicidade e após várias tentativas de uso dos mesmos sequencialmente, percebeu-se que poderia ser mais eficaz se fossem utilizados em combinação (9). O uso dos fármacos em combinação começou após a descoberta da lamivudina (3TC), que foi combinada com algum sucesso com a ZDV e a d4T, embora sem resultados que permitissem um controlo eficaz e duradouro. Assim, depois da Conferência sobre a SIDA em Vancouver em 1996, foi introduzido um esquema terapêutico que consistia na administração de três antirretrovirais em sinergia, designado por *Combination Antiretroviral Therapy* (cART, Terapêutica Antirretroviral Combinada). A descoberta de novas classes como os *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors* (NNRTIs, inibidores da transcriptase reversa análogos de não nucleósidos) e os *Protease Inhibitors* (PI, inibidores da protease) vieram permitir o uso de várias classes em combinação com o objetivo de um melhor controlo da doença (9,10).

Ao longo dos anos, foram sendo descobertas novas classes terapêuticas como os *Entry/Attachment Inhibitors* (inibidores de entrada/fusão) e os *Integrase Inhibitors* (INIs, inibidores da integrase) que permitiram aperfeiçoar as terapêuticas já existentes e promover

o HIV a uma doença crónica. Atualmente, a terapêutica adotada na maioria dos casos é designada por *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART, terapêutica antirretroviral de alta eficácia) e consiste no uso de dois NRTIs em associação com um NNITR, um inibidor da integrase, um inibidor da protease ou um inibidor de fusão (11).

Apesar do HIV-1 e o HIV-2 serem morfologicamente indistinguíveis apresentam algumas diferenças ao nível da estrutura do genoma e da antigenicidade das proteínas virais, o que parece ser responsável pelo maior período de latência do HIV-2 bem como, taxas mais baixas de progressão e transmissão da doença e valores de carga viral mais baixos (12,13). Assim, é possível perceber que o HIV-1, por ser mais virulento e infeccioso, provoca o maior número de infeções a nível mundial, quando comparado com o HIV-2 que se encontra mais circunscrito à África Ocidental e aos países que apresentam maior ligação com essa área geográfica (14,15). Os indivíduos infetados com esta estirpe menos virulenta são muitas vezes doentes que mantêm baixos níveis de replicação viral apesar de não estarem sujeitos a nenhuma terapêutica antirretroviral. Podem ser considerados *Long-Term Non Progressors* se mantiverem baixos níveis de carga viral e uma contagem de linfócitos TCD4+ elevada há mais de 10 anos sem terem recebido tratamento, ou então serem considerados *Elite Controllers*, em que a carga viral se encontra em níveis indetetáveis, ou *Virus Controllers* em que existem baixos valores de carga viral (16).

1.1.2. Organização Estrutural

O HIV é um retrovírus da família *Retroviridae*, pertencente ao género *Lentivirus*, de morfologia esférica com 100–120nm de diâmetro. Possui um invólucro constituído por uma bicamada fosfolipídica com origem na membrana celular do hospedeiro que apresenta à superfície glicoproteínas virais. A glicoproteína de superfície (SU), gp120/gp105, consoante seja HIV-1 ou HIV-2, que é responsável pelo reconhecimento dos recetores celulares está ancorada ao invólucro pela glicoproteína transmembranar (TM), gp41/gp36, sendo estas responsáveis pela mediação do processo de fusão do involucro do vírus com a membrana citoplasmática (12).

A cápside viral, na forma de cone truncado, é constituída pela proteína da cápside, (p24/p26/CA). Esta está envolta na matriz viral, constituída pela proteína da matriz (p17/MA), que mantém a integridade estrutural do virião. Dentro da cápside encontram-se duas moléculas de RNA viral protegidas pela nucleocápside (NC), a protease (PR) viral, a transcriptase reversa (RT), a integrase (IN), as proteínas reguladoras Tat, Rev e as proteínas acessórias Nef, Vif, Vpr e Vpu/Vpx (17). (Figura 1)

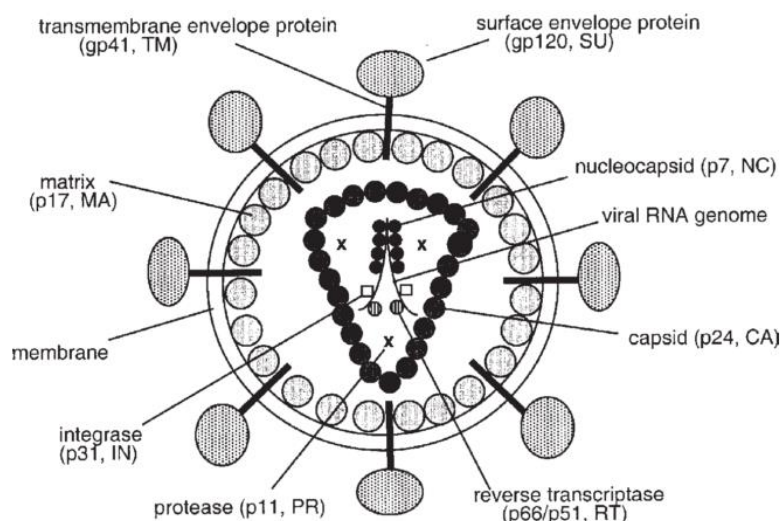


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do HIV-1. Encontra-se indicada a posição das principais proteínas virais, da bicamada fosfolipídica e do RNA genômico. (adaptado de Freed, E. O., 2001)

1.1.3. Organização Genômica

O genoma do HIV é constituído por duas moléculas de RNA idênticas, de cadeia simples, com cerca de 9 kb. Apresenta 2 regiões terminais não codificantes com cerca de 600 nucleótidos, designadas por repetições terminais longas (LTR), com a estrutura U3RU5. Nestas regiões LTR estão localizados promotores importantes que asseguram a transcrição do DNA proviral (18).

O RNA viral contém nove genes que, depois de traduzidos, originam quinze proteínas diferentes (18). Existem três genes responsáveis pela estrutura do virião: o gene gag, o gene pol e o gene env, que dão origem aos constituintes virais após clivagem. O gene gag dá origem às proteínas MA, CA (p24/p26) e NC (p7); o gene pol dá origem às enzimas virais: RT, PR e IN; e o gene env dá origem às proteínas presentes no invólucro viral, a gp120/gp105 e a gp41/gp36, consoante a estirpe seja de HIV-1 ou HIV-2, respetivamente (19). Existem ainda genes que codificam para proteínas reguladoras, sendo elas designadas por Tat e Rev, e para proteínas acessórias como a Nef, Vpr, Vif e Vpu, no HIV-1, ou Vpx, no HIV-2 (17). (Figura 2)

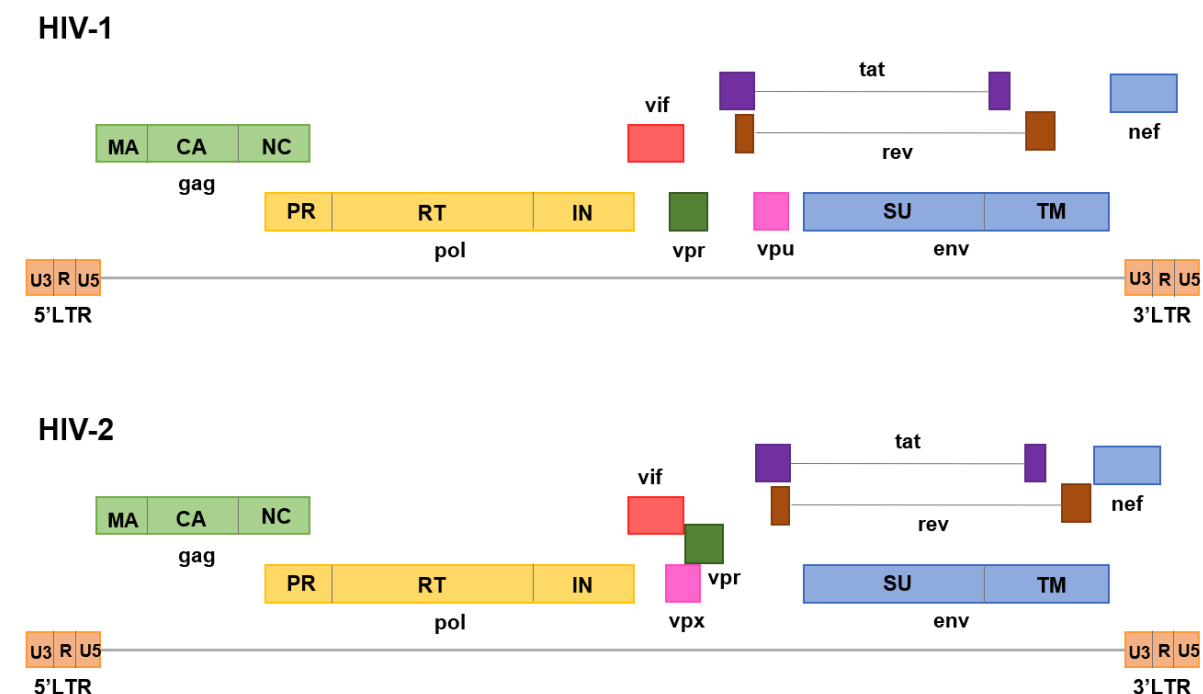


Figura 2 - Representação esquemática do genoma de HIV-1 e HIV-2. Estão identificadas as nove regiões codificantes, as extremidades LTR e as principais proteínas codificadas.

Nas tabelas seguintes, apresenta-se uma breve descrição das proteínas do HIV e das suas funções.

Tabela 1 – Principais funções das proteínas estruturais, reguladoras e acessórias do HIV. (12,20)

Proteínas estruturais	Funções
MA	Formação da camada interna da membrana viral. Mantém a integridade do virião.
CA	Constituinte da cápside viral.
NC	Formação do complexo nucleoproteína-RNA dentro do virião.
PR	Clivagem das poliproteínas Gag e Gag-Pol, originando as proteínas Gag e Pol maduras. Torna o vírus uma partícula infecciosa.
RT	Transcrição do RNA viral em DNA proviral.
IN	Integração do DNA proviral no DNA genómico do hospedeiro.
SU	Ligação do vírus à membrana da célula hospedeira.
TM	Fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira.

Proteínas reguladoras	Funções
Tat	Ativação e alongação do produto de transcrição. Proteína precoce e presente no núcleo.
Rev	Processamento e transporte dos mRNA, passagem da fase precoce para a fase tardia na expressão genética do HIV. Proteína precoce e presente no núcleo.

Proteínas acessórias	Funções
Nef	Degradação do CD4, apoptose, estimulação dos linfócitos T, diminuição do Complexo Principal de Histocompatibilidade I (MHC I), aumento da infecciosidade do vírus. Proteína precoce e presente no citoplasma e no virião.
Vif	Eficiência da retrotranscrição, formação e maturação da partícula viral e inibição da proteína celular antiviral APOBEC3G. Proteína tardia e presente no citoplasma e no virião.
Vpr	Importação do Complexo de Pré-Integração (PIC) para o núcleo e bloqueio do ciclo celular na fase G2. Proteína tardia e presente no citoplasma e no virião.
Vpu/Vpx	Degradação do CD4 e aumento da eficiência na libertação de viriões. Proteínas tardias e presentes no aparelho de Golgi e retículo endoplasmático (RE).

1.1.4. Ciclo Replicativo

Existem essencialmente duas fases no ciclo replicativo do HIV: a fase inicial e a fase tardia. A fase inicial começa com a ligação do vírus à membrana da célula hospedeira, através da interação da glicoproteína de superfície (gp120/gp105) com o recetor CD4+ que sofre uma alteração conformacional permitindo a ligação do vírus a um segundo recetor designado por correceptor. Os recetores das quimiocinas CCR5 e CXCR4 estão descritos como sendo os correceptores mais utilizados, sendo que esta ligação é extremamente importante para que a infeção da célula hospedeira ocorra (21,22).

Consoante o correceptor a que se ligam preferencialmente, os vírus podem ser classificados como tendo tropismo para CCR5, tropismo para CXCR4 ou tropismo duplo (utilização dos dois coreceptores em simultâneo). Esta ligação ao correceptor induz uma alteração conformacional da glicoproteína transmembranar (gp41/gp36) que permite a fusão da partícula viral com a célula hospedeira, com entrada da nucleocápside do vírus na célula (17,23). Após entrada na célula hospedeira, a nucleocápside é destruída por ação de enzimas celulares (descapsidação), expondo as duas cópias de RNA do HIV, bem como as enzimas virais, nomeadamente a transcriptase reversa, a integrase e a protease (24).

De seguida, dá-se início à retrotranscrição do vírus, que consiste na transcrição do RNA viral numa cadeia híbrida de RNA/DNA complementar (cDNA), sendo este processo mediado pela transcriptase reversa. A RT é também responsável pela degradação da porção de RNA da cadeia híbrida através da ação da RNaseH, sintetizando de seguida outra cadeia de DNA tendo como molde o cDNA sintetizado anteriormente (24). Esta enzima tem um elevado erro de transcrição associado que provoca o aparecimento de mutações no DNA sintetizado, originando uma elevada variabilidade genética, sendo esta uma característica que permite ao HIV escapar à resposta imunitária do hospedeiro (25). O produto resultante da retrotranscrição é uma dupla cadeia de DNA que será transportada para o núcleo para ser integrada no genoma da célula hospedeira. O transporte desta dupla cadeia para o núcleo é um processo ainda pouco conhecido, existindo várias teorias sobre como se processa (23,26).

Já no núcleo, a integração do genoma viral no genoma do hospedeiro é dirigida pelas sequências das regiões LTR e catalisada pela integrase viral. O DNA viral integrado (provírus) torna-se, assim, parte integrante do genoma da célula hospedeira que, deste modo, adquire a capacidade de produzir novos viriões (18).

A produção de partículas virais dá início à fase tardia do ciclo de vida do HIV com o início da transcrição do provírus pela RNA Polimerase II celular através da ligação de fatores celulares a elementos promotores da região LTR do provírus. São produzidas as proteínas Tat, Rev e Nef e assim que se atinge um nível basal das mesmas, a proteína Tat aumenta significativamente a velocidade de transcrição da RNA Polimerase II, aumentando a produção de mRNA viral (17,27). Na ausência de Tat, as RNA polimerases não possuem uma elevada capacidade de elongação do mRNA, não sendo capazes de transcrever sequências maiores que algumas centenas de nucleotídeos e, por isso, esta proteína tem uma atividade muito importante na ativação e elongação da transcrição (28,29).

A proteína Rev é responsável pelo processamento e transporte das três classes de RNAs, os mRNAs multiprocessados, os parcialmente processados e os não processados, para o citoplasma onde podem ser traduzidos pelos ribossomas da célula hospedeira ou podem ser diretamente incorporados em novas partículas virais (17,29,30).

A tradução citoplasmática dos mRNAs virais origina as proteínas Vif, Vpr, Nef, além das poliproteínas Gag e Gag-Pol. Quando clivada, a poliproteína Gag (p55) dá origem à MA (p17), CA (p24), NC (p7) e a poliproteína Gag-Pol dá origem à PR, RT e IN. As proteínas do envelope, glicoproteína de superfície (gp120/gp105) e glicoproteína transmembranar (gp41/gp36), são obtidas pela clivagem da glicoproteína gp160 proveniente da transcrição do gene *env*, e são introduzidas na membrana plasmática da célula formando *clusters* (29).

Um passo muito importante na montagem do material viral necessário para a formação de novas partículas virais é a diminuição da presença de recetores CD4+ na superfície da célula para que não exista interação entre os mesmos e as proteínas gp120/gp105 recém formadas, estando as proteínas Nef e Vpu envolvidas neste processo (12,17). A proteína Nef é também responsável por uma diminuição da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II, com consequente diminuição da resposta imunitária do indivíduo

à célula infetada. Por seu lado, a proteína Vpu ao degradar os recetores CD4 recém sintetizados que se encontravam associados com a glicoproteína precursora do envelope gp160, permite que esta seja transportada para a membrana celular (17,31).

A poliproteína Gag (p55) vai permitir a reunião de todo o material viral necessário para a formação de novas partículas virais, nomeadamente as duas cadeias de RNA viral e as restantes proteínas e enzimas virais, junto à parte interna da membrana celular e a Vpu vai aumentar a libertação de viriões (32).

A libertação dos viriões ocorre por um processo de gemulação que resulta na saída de uma partícula viral imatura da célula hospedeira. Para que a partícula viral se torne infecciosa é necessária a sua maturação, através da ação da protease sobre as poliproteínas Gag e Gag-Pol dando origem às proteínas Gag e Pol maduras. Este processo implica uma forte reorganização das proteínas dentro da partícula viral com consequente formação da cápside cónica (17,33).

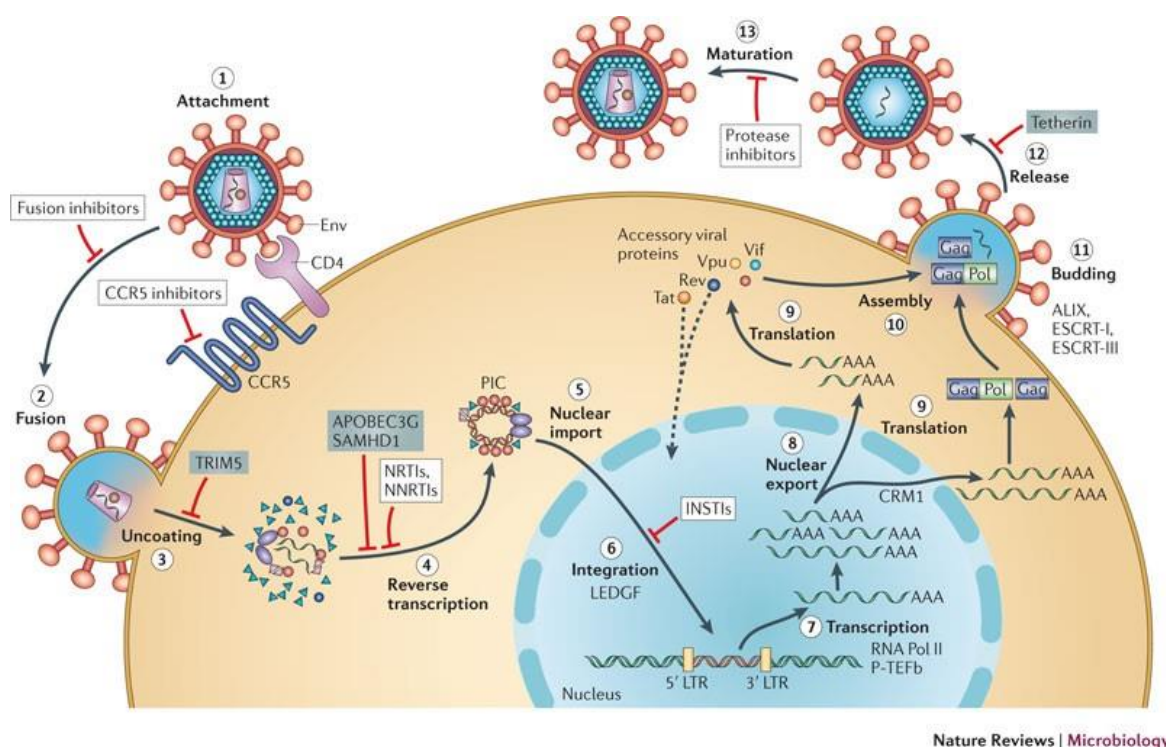


Figura 3 - Ciclo replicativo do HIV. 1) Ligação entre a glicoproteína de superfície e o recetor CD4+, com posterior ligação ao correceptor (CCR5 ou CXCR4), permite a ancoragem do vírus à célula; 2) Fusão da membrana celular hospedeira com a membrana viral, entrando da partícula viral na célula; 3) Descapsidação da cápside viral, com exposição do RNA viral e das proteínas virais; 4) Início da retrotranscrição, com formação de DNA viral através da ação da RT no RNA viral; 5) Importação do DNA viral do citoplasma para o núcleo; 6) Integração do DNA viral no genoma do hospedeiro; 7) Transcrição do provírus pela RNA Polimerase II celular, originando mRNAs correspondentes ao genoma e às várias proteínas e genoma virais; 8) Exportação dos mRNAs recém transcritos do núcleo para o citoplasma; 9) Tradução dos mRNAs virais em proteínas virais; 10) Montagem ou reunião dos componentes virais; 11) Formação do virião; 12) Libertação do virião da célula hospedeira; 13) Maturação do virião através da ação da protease viral, originando um virião infeccioso. (adaptado de Engelman, A. et al., 2012)

Existem dois modos pelos quais o HIV pode entrar numa célula: por infeção *cis* ou por infeção *trans*. A infeção *cis* consiste na entrada do vírus na célula, com a integração genoma viral no genoma celular, permitindo a formação de viriões infecciosos. Pelo contrário, a infeção *trans* consiste na endocitose do vírus por parte de células apresentadoras de antígenos (APC), que, após contacto célula-célula com linfócitos T CD4+ ou outras células suscetíveis à infeção pelo HIV, permitem a passagem das partículas virais originando infeção nas células com as quais contactaram, sendo esta uma infeção produtiva ou não (34).

1.1.5. Infeção CD4⁺ - Independente

Alguns estudos têm vindo a demonstrar que existem células que podem ser infetadas pelo HIV sem que este utilize o recetor CD4+, como é o caso dos fibroblastos, das células epiteliais, renais, hepáticas e nervosas, e de células TCD8+ (35,36). Nestes casos, pensa-se que exista uma exposição dos locais de ligação da glicoproteína de superfície ao correceptor sem que exista uma ligação prévia ao recetor CD4+, permitindo a entrada do vírus na célula (37,38).

Este mecanismo de infeção alternativo permite explicar a presença de partículas virais em células que, à partida, não seriam infetadas pelo HIV, como é o caso dos astrócitos, oligodendrócitos e neurónios que não expressam o recetor CD4, e dos macrófagos e células da microglia que tem baixos níveis deste mesmo recetor (39). As alterações causadas nestas células pela presença do vírus podem ser responsáveis pelo aparecimento de patologias associadas ao HIV no hospedeiro, como são exemplo as doenças neurodegenerativas, o cancro e as nefropatias associadas ao HIV (40).

1.1.6. Células Envolvidas na Patogénese do HIV

A entrada do HIV nas células depende, geralmente, de uma primeira ligação a um recetor celular específico, o recetor CD4, e a um coreceptor, o CCR5 e o CXCR4. Estes coreceptores estão descritos como os mais importantes para a patogénese da infeção pelo HIV existindo, no entanto, outros recetores com um papel relevante na entrada do vírus na célula. Estes recetores podem ser encontrados na superfície de várias células, entre elas, os linfócitos T CD4+, os monócitos, as células dendríticas e células do sistema nervoso (41,42). É cada vez mais importante compreender a suscetibilidade destas células à infeção pelo HIV, dada a possibilidade de se tornarem reservatórios virais e das alterações funcionais que possam ocorrer, revelando assim a importância do papel que estas desempenham na patogénese da infeção.

1.1.7. Células Sanguíneas

1.1.7.1. Linfócitos T CD4+

Os linfócitos T CD4+ ou linfócitos T auxiliares, são uma parte importante da resposta imune adquirida, uma vez que participam no reconhecimento de antígenos proteicos apresentados por moléculas de MHC de classe II, presentes à superfície de APCs. Pensa-se que o recetor CD4 possa influenciar o complexo formado entre MHC II/antígeno e o recetor das células T (TCR), favorecendo a transdução de sinal que leva a ativação dos linfócitos T (43,44). A ativação dos linfócitos T CD4+ leva à libertação de citocinas, permitindo a ativação de outras células como macrófagos, linfócitos T CD8+ e linfócitos B (43).

A ativação dos linfócitos T CD4+ resulta da interação do MHC classe II, presente à superfície das APCs, com os seus recetores. O recetor CD4 funciona como correceptor, potenciando a interação dos recetores com o MHC da APC. Devido ao tropismo do HIV para os recetores destas células, estes tornam-se suscetíveis à infeção que leva a uma depleção dos linfócitos T CD4+ devido à sua morte por apoptose (causa direta da infeção) e à morte devido à resposta imune do hospedeiro. Isto leva a uma deficiência imunitária e uma maior suscetibilidade a infeções oportunistas (45).

Tendo os linfócitos T CD4+ um papel tão importante na ativação da resposta imune e, dado que uma das características da imunodeficiência da infeção pelo HIV, é a diminuição da contagem de T CD4+, o indivíduo infetado e não tratado torna-se mais suscetível a doenças oportunistas que podem levar à morte (17,46).

1.1.7.2. Monócitos/Macrófagos

Os monócitos e macrófagos, em conjunto com outras células do sistema imunitário, são responsáveis pela eliminação de potenciais agentes infecciosos do indivíduo. Estas células são diferentes entre si, uma vez que expressam diferentes recetores membranares à superfície, produzem diferentes citocinas como resposta a estímulos imunitários e têm diferente suscetibilidade à infeção pelo HIV (47). Os monócitos são células imunes que circulam na corrente sanguínea e que são responsáveis pela manutenção de uma quantidade adequada de macrófagos nos tecidos devido à sua capacidade de sair da corrente sanguínea para os tecidos e se diferenciarem em macrófagos (48). Por sua vez, os macrófagos encontram-se nos tecidos e lá exercem as suas funções de célula efetora do sistema imunitário (48).

Tanto os monócitos como os macrófagos desempenham um papel importante na imunidade inata e adquirida, por serem co ativadores de células B e T ao serem apresentadores de antígenos e por secretarem citocinas pró-inflamatórias, mas também por terem funções de fagocitose de microrganismos como bactérias, fungos e parasitas (47).

Estas células são passíveis de ser infetados *in vivo*, mas sabe-se que os macrófagos são as células mais suscetíveis à infeção. No entanto, ambos expressam o recetor CD4+, bem

como os corretores necessários à entrada do vírus, sendo o CCR5 o corretor mais utilizado para infectar estas células. Dada a sua função imunitária importante é de esperar que, quando estas células são infectadas pelo HIV, esta função fique comprometida, permitindo o aparecimento de infeções oportunistas, e, por serem resistentes aos efeitos citopáticos do HIV, são capazes de disseminar a infeção aos tecidos sem serem detetados (47,49). Tendo em conta esta capacidade de passarem barreiras sem serem detetados como células infectadas, os monócitos são capazes de passar a barreira hematoencefálica (BHE) e diferenciar-se em macrófagos dando início à neuroinvasão pelo HIV, contribuindo para o aparecimento de doenças neurodegenerativas associadas ao HIV através da produção de citocinas pró inflamatórias e outras neurotoxinas (47,50).

1.1.7.3. Células Dendríticas

As células dendríticas são as células apresentadoras de antígenos mais conhecidas e são muito importantes na imunidade do indivíduo, por serem uma ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida, ao serem capazes de fagocitar e processar microrganismos, ativando outras células do sistema imunitário como os linfócitos T (51). (52)

Tal como os monócitos e os macrófagos, também as células dendríticas apresentam à superfície o recetor CD4+ e os dois corretores necessários para a entrada do vírus na célula, embora em baixas quantidades (53). Quando comparado com a infeção em linfócitos T CD4+, estas células apresentam uma menor produtividade de viriões infecciosos, que se acredita que esteja relacionada com a baixa expressão dos recetores e corretores à superfície, mas também uma capacidade de degradar o vírus após a sua internalização (54–56). Outro fator que pode limitar a produtividade da infeção de HIV nestas células é a expressão de fatores que bloqueiam a replicação viral, como é o caso da proteína antirretroviral APOB3G, que se pensa ser um mecanismo importante da imunidade inata contra as infeções de retrovírus (54,57).

Quando são infectadas pelo HIV, para além de verem as suas funções limitadas pela presença do vírus, as células dendríticas adquirem uma capacidade migratória aumentada para os tecidos linfáticos mas não expressam à sua superfície os marcadores que iniciariam uma resposta imunitária adequada (51). Assim, acredita-se que as células dendríticas possam funcionar como um reservatório viral que permite uma exposição do vírus durante mais tempo aos linfócitos T, perpetuando a infeção (54,58).

1.1.8. Infeção do SNC

Há muito tempo que se reconhece a existência de uma síndrome clínica caracterizada por um comprometimento gradual das capacidades físicas e psicológicas de indivíduos infectados pelo HIV, especialmente quando já infectados há algum tempo (59). Esta síndrome foi denominada por *AIDS dementia complex* (ADC, demência associada à SIDA), apresentando

sintomas ao nível das funções motoras, cognitivas e comportamentais. Ao nível motor, os indivíduos apresentam perda de equilíbrio e lentidão nos movimentos. Em termos comportamentais, os indivíduos podem desenvolver perturbações do humor, apatia e dificuldades de socialização. Ao nível cognitivo, começam a surgir défices de atenção e memória (59,60).

O uso cada vez mais universal da terapêutica antirretroviral pelos portadores do vírus, permitiu a diminuição da carga viral até limites indetetáveis e a diminuição de infeções oportunistas, mas também melhorou os sintomas associados à infeção no SNC (60). Contudo, mesmo em casos em que se registou uma diminuição da carga viral no sangue periférico que permitiu atingir uma cronicidade da infeção pelo HIV, foi possível perceber que a degeneração neuronal continua a ser um problema para muitos portadores do vírus, existindo atualmente uma forma de demência associada ao HIV menos grave, designada por *minor cognitive motor disorder* (MCMD), possivelmente devido à baixa penetração da terapêutica através da BHE (60–62). Estas doenças neurodegenerativas resultam de uma disfunção neuronal causada por fatores externos aos neurónios, uma vez que se acredita que estas células não são suscetíveis ao HIV, com consequências que podem ir de demência, a mielopatias mas também a neuropatias sensoriais (62,63).

A capacidade de penetração da terapêutica antirretroviral é um aspeto importante a ter em conta, uma vez que, quando esta é baixa ou a terapêutica não atinge níveis suficientes para suprimir a replicação viral, os doentes continuam a apresentar sintomas e complicações neurológicas. Outro aspeto a ter em conta é que os macrófagos, ao contrário dos linfócitos T CD4+, são células mais resistentes aos efeitos dos antirretrovirais, especialmente quando se encontram no SNC (64). Na terapêutica antirretroviral atual, a sua capacidade de penetração através da BHE é variável, sendo que aumenta quando existe já um comprometimento da BHE. Sabe-se que a zidovudina é o fármaco que tem uma melhor penetração no SNC e que, no que diz respeito aos restantes NRTIs e NNRTIs estes apresentam apenas uma penetração parcial. Em relação aos inibidores de fusão e aos inibidores da integrase, ambas as classes apresentam uma baixa capacidade de penetrarem no parênquima cerebral (50,65). Tendo em conta estes dados, é importante que se invista na procura de novos agentes terapêuticos ou no melhoramento dos já existentes, de modo a aumentar a sua capacidade de penetração da BHE e a sua eficácia no SNC.

Atualmente, acredita-se que a entrada do vírus no cérebro é feita na fase inicial da infeção, não se sabendo, no entanto, se permanece escondido/controlado pela resposta imune ou se é eliminado e volta a reentrar no SNC nas fases tardias da infeção (39). Alguns investigadores acreditam que o vírus vai entrando no SNC várias vezes ao longo da infeção e que existe uma compartimentalização do vírus no SNC, ou seja, a existência de partículas virais que apresentam diferenças genéticas quando comparadas com as partículas virais que se encontram na corrente sanguínea ou nos nódulos linfáticos do mesmo indivíduo (39,66). Foram realizados estudos genéticos e funcionais que permitissem perceber quais as consequências das diferenças entre as partículas virais provenientes do SNC e da corrente sanguínea/nódulos linfáticos, revelando uma menor dependência do recetor CD4+ para

entrada nas células por parte das partículas virais provenientes do SNC (67). Assim, acredita-se que as partículas virais se tenham adaptado ao microambiente do parênquima cerebral e tenham passado a depender menos do recetor CD4+ para infetar células, visto que este é expresso em menor ou nenhuma quantidade nas células do SNC, como é o caso de macrófagos e microglia, e astrócitos, neurónios e oligodendrócitos, respetivamente (66).

Existem alguns estudos que indicam que as células do SNC podem constituir um reservatório importante de partículas virais, explicando como é que o HIV pode permanecer escondido nas células cerebrais e iniciar uma maior replicação viral nas fases tardias da infeção (64). Nestes estudos, que utilizavam o *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV, vírus da imunodeficiência símia) como modelo da infeção cerebral causada pelo HIV devido às suas semelhanças, foram usados macacos sob a terapêutica HAART e outros sem tratamento, e foi possível perceber que, apesar de existir uma diminuição da circulação de RNA viral na corrente sanguínea, foi possível detetar DNA viral nas células cerebrais dos macacos, indicando que existiriam reservatórios virais onde o vírus poderia permanecer em latência e, posteriormente, ser capaz de iniciar infeções produtivas mesmo quando os macacos se encontravam sob terapêutica HAART (64,68).

A passagem da barreira hematoencefálica pode ocorrer por 3 vias (figura 4), sendo a teoria mais apoiada a do “Cavalo de Tróia”, que consiste na passagem de monócitos ou linfócitos T CD4+ infetados através da BHE, sem que seja detetada a presença do vírus no interior destas células, permitindo a infeção do SNC (39,69). Alguns estudos permitiram comprovar esta teoria, recorrendo à hibridação *in situ* e a análises imunohistoquímicas, permitindo perceber que existe uma acumulação viral nas regiões perivasculares da BHE (70). Existem também teorias que consideram que a entrada do HIV no SNC pode ocorrer por migração livre do vírus entre as células endoteliais da BHE ou por transcitose através das mesmas (39,71).

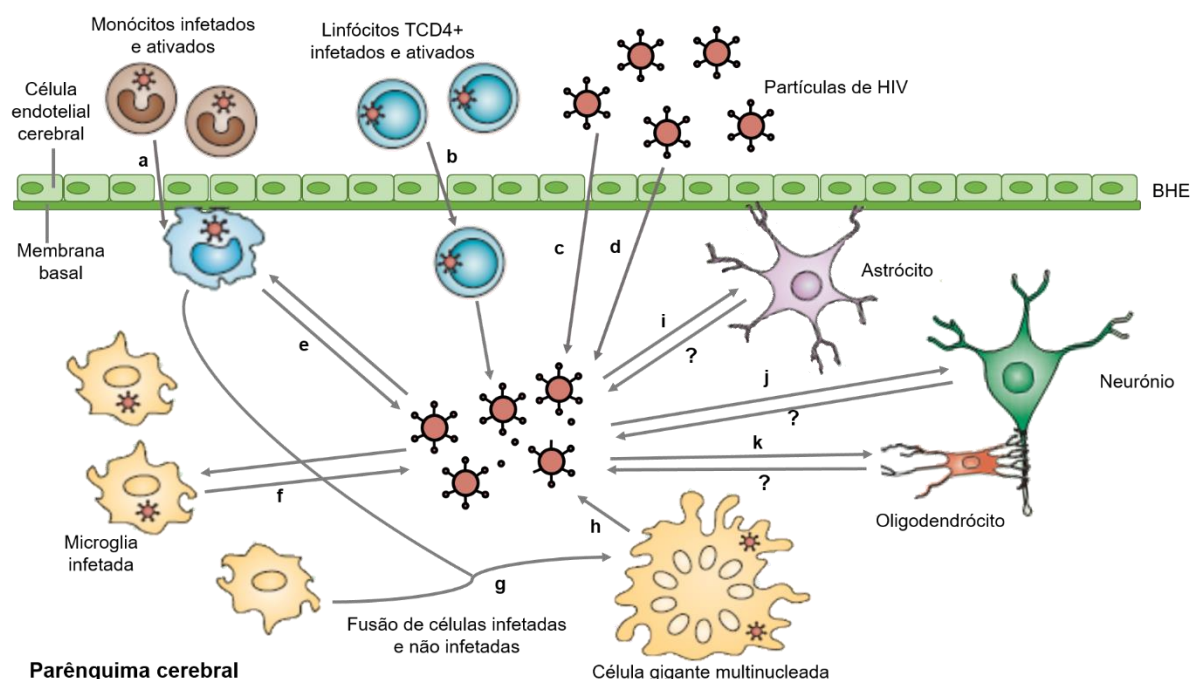


Figura 4 - Entrada do HIV no SNC. a) A teoria mais apoiada em relação à entrada do HIV no cérebro é a do Cavalo de Tróia ("Trojan Horse"), com a passagem do vírus dentro de a) macrófagos infectados e b) linfócitos T CD4+ infectados, sendo, no entanto, menos provável devido à semelhança dos vírus presentes no cérebro com os vírus existentes em monócitos/macrófagos; c) Outra hipótese de entrada do HIV no SNC é a migração direta do vírus por entre as células endoteliais cerebrais; d) Alguns autores acreditam também que possa ser possível uma passagem do HIV por transcitosose para o parênquima cerebral; e) Os macrófagos perivasculariais parecem ser os principais produtores de partículas virais no cérebro; f) As células de microglia que são infectadas posteriormente aos macrófagos perivasculariais contribuem para a produção de partículas virais, bem como para alguns mecanismos de neuropatogénese; g) A fusão de células de microglia e macrófagos infectados resulta na ocorrência de células gigantes multinucleadas; h) Antes de morrerem, as células gigantes multinucleadas são capazes de contribuir para a produção de vírus no parênquima cerebral; i) Sabe-se que os astrócitos são células passíveis de serem infectadas pelo HIV mas esta infecção parece não ser capaz de originar a produção de vírus, sendo, por isso, considerada não produtiva, dando origem a reservatórios virais; j) e k) Tanto a infecção pelo HIV em oligodendrócitos como neurónios tem sido alvo de debate, uma vez que alguns autores foram capazes de detetar proteínas e RNA viral nestas células, enquanto outros não o conseguiram em condições semelhantes. Se estas células forem infectadas pelo HIV não são capazes de contribuir para a produção de partículas virais, tendo também sido consideradas como tendo uma infecção não produtiva, funcionando como reservatórios virais. (Adaptado de González-Scarano, Francisco; Martín-García, Julio, 2004.)

De acordo com a teoria do Cavalo de Tróia, após entrada das células infectadas no parênquima cerebral, ocorre a diferenciação dos monócitos em macrófagos perivasculariais que em conjunto com os TCD4+ irão disseminar a infecção para o SNC. Além da infecção dos macrófagos perivasculariais que já se encontram no parênquima cerebral, também as células de microglia vão ser infectadas primeiramente (39).

1.1.8.1. Microglia

As células de microglia foram descritas por Rio-Hortega, em 1919, como a terceira população de células da glia, tendo origem e funções diferentes dos neurónios e da neuroglia (até então considerando apenas astrócitos e oligodendrócitos) (72). Atualmente, sabe-se que a microglia consiste em fagócitos mononucleados que têm um papel imunitário muito

importante no Sistema Nervoso Central (SNC). Estas células são a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos e quando ativadas são capazes de conferir proteção neuronal ou, em determinados casos, exacerbar doenças neurológicas pré-existentes (73).

Sabe-se que as células de micróglia são as principais responsáveis pela manutenção de uma infeção produtiva no SNC e podem constituir um reservatório importante de partículas virais, mesmo quando os indivíduos se encontram sujeitos a terapêutica antirretroviral (66). Vários estudos foram mesmo capazes de detetar cópias de RNA viral no líquido cefalorraquidiano (LCR) em indivíduos que não apresentavam quaisquer sintomas de distúrbios neurocognitivos (74), sendo esses números ainda mais expressivos nos estudos que analisaram o LCR de indivíduos que já apresentavam alguns problemas neurocognitivos (75).

A ativação das células de micróglia pode ocorrer por infeção direta pelo HIV, por interação com proteínas virais ou por estímulos imunitários vindos de células infetadas (69,76). Quando infetadas pelo HIV, as células de micróglia secretam citocinas (IL-1 β), quimiocinas (α e β -quimiocinas), prostaglandinas, Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), Fator de Ativação Plaquetário (PAF) e vários aminoácidos excitatórios que provocam neurotoxicidade, com diminuição ou perda de sinapses entre neurónios (76).

1.1.8.2. Astrócitos

Os astrócitos são as células mais abundantes no cérebro e são muito importantes na manutenção da homeostase cerebral, uma vez que são responsáveis pela regulação da concentração de iões, metabolitos e neurotransmissores (especialmente o glutamato), envolvem neurónios e vasos sanguíneos e fazem também parte da BHE (77).

Ao contrário das células comumente infetadas pelo HIV, os astrócitos não expressam o recetor CD4 mas expressam os corretores CCR5 e CXCR4 (69,78). Isto significa que a infeção dos astrócitos por HIV é feita de modo independente do recetor CD4 (77). Alguns estudos demonstraram que a infeção dos astrócitos é conseguida maioritariamente por contacto entre células infetadas e astrócitos não infetados (77,78). No entanto, após entrada do vírus nos astrócitos não se observa uma infeção produtiva mas sim um estado de latência do vírus, muitas vezes com integração do genoma viral (79).

Verifica-se também um aumento da infeção de astrócitos por HIV em fases mais avançadas da infeção sistémica, possivelmente devido ao comprometimento da BHE ou à libertação de fatores inflamatórios por parte de outras células cerebrais (78). A ação destes fatores inflamatórios desregula também o mecanismo de homeostase cerebral pelo qual os astrócitos são responsáveis e provoca mecanismos de feedback positivo, levando a uma maior proliferação de células da microglia ou macrófagos perivasculares infetados. Esta sinergia acaba por favorecer o aparecimento ou o aumento da magnitude das doenças neurodegenerativas (69).

1.1.8.3. Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são as células gliais responsáveis pela formação e manutenção das bainhas de mielina que envolvem os axónios dos neurónios, sendo estas membranas lípido-proteicas responsáveis pelo isolamento dos axónios, tendo como objetivo o aumento da velocidade de condução dos impulsos nervosos (39,80).

A possibilidade da infeção pelo HIV em oligodendrócitos ainda é controversa, uma vez que estas células não apresentam o recetor CD4, mas têm presente o correceptor CXCR4 que também pode ser utilizado pelo HIV e acredita-se que seja através de uma infeção CD4-independente que o vírus seja capaz de infetar estas células (81). Dois estudos realizados com o objetivo de compreender melhor se estas células seriam suscetíveis ao HIV foram capazes de detetar DNA viral através do uso de PCR *in situ* (82,83) e um outro estudo *in vitro* sugeriu que existe a possibilidade dos oligodendrócitos serem infetados por outras células do SNC mas não permitirem uma infeção produtiva (80). Esta infeção do tipo não produtivo, ou seja, uma infeção que não origina partículas virais que permitam a disseminação da infeção, parece indicar que estas células funcionem como um reservatório viral e que sejam importantes na neuropatogénese (39,71).

Sabe-se que ocorrem alterações ao nível das bainhas de mielina mas ainda não se sabe se é a infeção direta pelo HIV que causa estas alterações ou se ocorrem devido à libertação de mediadores inflamatórios por parte de outras células do SNC (80,81). A perda de integridade das bainhas de mielina pode alterar as vias de sinalização entre estas células e neurónios e originar degeneração neuronal, dando origem a disfunções neurológicas características de doentes com HIV mesmo que sujeitos a terapêutica antirretroviral (84).

1.1.8.4. Neurónios

Os neurónios são a principal unidade funcional do SNC e são responsáveis pela propagação de impulsos nervosos que originam as funções motoras e cognitivas (39).

Tal como os oligodendrócitos, os neurónios não expressam o recetor CD4, mas apresentam à superfície outros recetores de quimiocinas que o HIV utiliza como correceptores. Contudo, pensa-se que estes recetores são importantes para a migração e desenvolvimento neuronal, bem como para as respostas neuronais de sobrevivência ou de apoptose, e não tanto como portas de entrada para o HIV (39).

No entanto, a infeção destas células ainda é um tema pouco esclarecido, uma vez que ainda se acredita que a infeção destas células não ocorra *in vivo*, mas já foi possível detetar DNA e proteínas virais em estudos *in vitro* com neurónios (82,83). Foi também possível detetar infeções não produtivas em linhas primárias de neurónios (85) e em culturas com linhas celulares de neurónios (86,87).

Apesar da infecção direta ou indireta de neurónios ser ainda discutida entre os investigadores, é geralmente aceite a ocorrência de disfunções neuronais causadas, maioritariamente, devido à libertação de fatores pró-inflamatórios e neurotoxinas pelas outras células do SNC (79). Estas substâncias são capazes de provocar morte neuronal, com aumento da incidência de doenças neurodegenerativas, e desregulação da BHE, com a possibilidade de aumentar a entrada de mais partículas virais para o parênquima cerebral, exacerbando os problemas neurológicos (50,79).

Devido ao papel fulcral das células presentes no SNC na imunidade e homeostase cerebral, é importante compreender o mecanismo patogénico entre o HIV e as células do SNC, tendo em vista novas oportunidades terapêuticas que permitam a diminuição da incidência de doenças neurodegenerativas em indivíduos com HIV.

2. Objetivos

Há muito tempo que se reconhece a existência de doenças neurológicas associadas ao HIV que fazem aumentar a morbilidade e a mortalidade da população infetada. No entanto, ainda não é claro como é que se pode travar o avanço dessas doenças, uma vez que a terapia antirretroviral ainda não é suficiente para impedir o aparecimento destas comorbilidades (61,63). Este projeto teve como objetivo proporcionar uma maior compreensão, de uma forma mais completa, dos mecanismos patogénicos associados às doenças neurodegenerativas que ocorrem em indivíduos infetados com HIV e o comportamento das células cerebrais como possíveis reservatórios virais.

Um dos principais objetivos específicos deste projeto foi a melhor compreensão da infeção *trans* de células da microglia e astrócitos pelas células do sangue periférico, com diferentes estirpes primárias de HIV-1 e HIV-2. Um dos pontos principais que pretendemos compreender foi se seria necessário ou não um contacto célula-célula para que ocorresse infeção, e numa tentativa de simular o que acontece *in vivo*, testamos duas vertentes diferentes: 1) co-cultura de células, sem a presença de uma barreira física entre as células (*mixed culture*); e 2) co-cultura de células, na presença de uma barreira física entre as células (*transwell co-culture*). Este estudo permite verificar se as diferentes populações celulares são igualmente infetadas pelas estirpes em estudo e em que condições isto acontece de forma mais eficaz (contacto célula-célula ou através de uma barreira física), e comparar a cinética de replicação. Nas células que não apresentaram infeção produtiva recorreremos à técnica de *nested-PCR* para perceber se teria existido integração do DNA viral nas células nervosas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Vírus

As estirpes virais utilizadas foram o HIV-1_{UCFL1032} e o HIV-2_{UCFL2074}, tendo sido escolhidas da Viroteca-Seroteca da Host-Pathogen Interaction Unit (HPIU) do iMed.Ulisboa, como descrito anteriormente (88). A escolha das estirpes tomou em consideração alguns critérios como a capacidade de infetar macrófagos derivados de monócitos (MDM) e quais os corretores usados pela estirpe para infetar as células (CCR5 ou CXCR4), apresentado na tabela 2.

Tabela 2 - Dados relativos aos isolados primários de HIV-1 e HIV-2 utilizados.

Isolado	Fase Clínica	Capacidade de infetar MDM	Biotipo
UCFL1032	ND	+	X4
UCFL2074	ND	+	R5X4

3.2. Células

A linha celular de microglia (CHME-3) utilizada, cedida por *Neuron-Glia in Health and Disease*, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, foi obtida através da imortalização de uma cultura de células primárias de microglia fetal humana com um mutante do vírus símio 40 (SV40, poliomavírus). Foi mantida em cultura celular a 37°C com 5% CO₂, em meio DMEM suplementado com 10% Soro Bovino Fetal (SBF), 100 UI/ml Penicilina/Estreptomicina e 2 mM L-Glutamina (*GE Hyclone, UK*).

A linha celular de astrócitos, SGV-mm, foi cedida por *Chemical Engineering Processes and Forest Products Research Center*, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Os astrócitos foram obtidos de células gliais fetais imortalizadas também com um mutante do SV40. Foram mantidos em cultura celular a 37°C com 5% CO₂, em meio DMEM suplementado com 10% SBF, 100 UI/mL Penicilina/Estreptomicina, 2 mM L-Glutamina e 50µg/mL Gentamicina (*GE Hyclone, UK*).

As células primárias (linfócitos T CD4+ e monócitos) foram obtidas a partir de *buffy coats* de dadores saudáveis, cedidos pelo Instituto Português do Sangue. Através do método do gradiente de Ficoll foi possível obter as células mononucleadas do sangue periférico (CMSP), das quais fazem parte as populações pretendidas. O isolamento de linfócitos T CD4+ e de monócitos foi conseguido por separação imunomagnética, tendo sido utilizado para os linfócitos T CD4+ o kit CD4+ T Cell Isolation Kit, human (*MACS® Miltenyi Biotec, Germany*) e para os monócitos o kit *CD14 MicroBeads, human (MACS® Miltenyi Biotec, Germany)*. Os linfócitos T CD4+ foram estimulados durante três dias com fitohemaglutinina (PHA, *SIGMA, USA*) que potencia a atividade mitótica e a rápida multiplicação celular dos linfócitos. Após estes três dias, foi adicionada IL-2 que estimulou a maturação dos linfócitos T CD4+,

favorecendo a expressão do correceptor CCR5 à superfície da célula. Por seu lado, os monócitos foram incubados durante três horas com meio RPMI 1640 de modo a permitir a sua adesão. Após adesão de 90% dos monócitos, foi adicionado meio RPMI 1640 suplementado com 10% SBF, 1% Piruvato de sódio, 1% Penicilina/Estreptomicina, 0,1% de Mercaptoetanol (*GE Hyclone, UK*) e Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF, *Immunotools, Germany*), uma citocina que estimula a diferenciação dos monócitos em macrófagos, de modo a obter uma concentração final de 20ng/ml por poço.

3.3. Ensaios de infecciosidade

Nos ensaios de infecciosidade, com duração de 7 dias, foram utilizadas as estirpes HIV-1_{UCFL1032} e HIV-2_{UCFL2074}. A figura 5 apresenta uma representação esquemática dos ensaios realizados neste projeto, nas várias condições utilizadas.

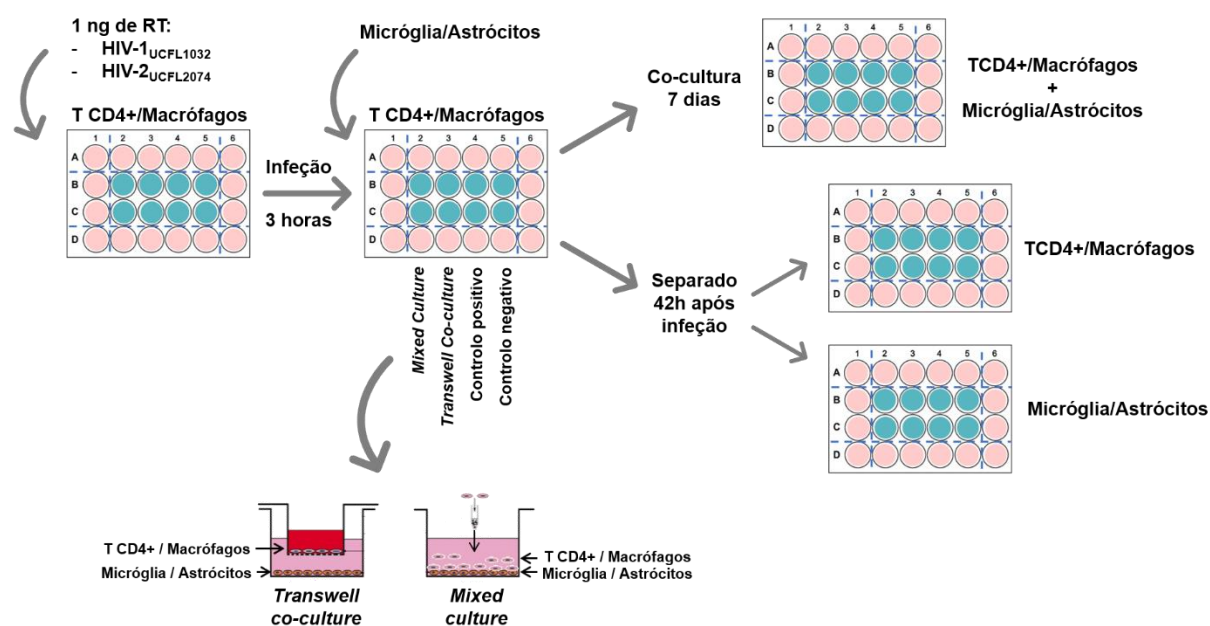


Figura 5 - Representação esquemática dos ensaios de infecciosidade. As células dadoras (linfócitos TCD4+e macrófagos) e as células-alvo (micróglia e astrócitos) foram mantidas em duas condições diferentes: 1) co-cultura durante 7 dias; 2) separadas 42 horas após a infecção. Os linfócitos TCD4+ e os macrófagos foram mantidos em *mixed culture* ou *transwell co-culture*.

As células dadoras (linfócitos T CD4+ e macrófagos) e as células-alvo (micróglia e astrócitos) foram mantidas em *mixed cultured* (co-cultura que permitem o contacto célula dadora-célula alvo) e *transwell co-culture* (co-cultura em que as células dadoras estão separadas por uma barreira física – *transwell* – das células-alvo). As células foram mantidas em duas condições distintas a) co-cultura durante 7 dias, e b) separação da co-cultura 42 horas após a infecção.

No dia da infecção, as células dadoras (linfócitos TCD4+, densidade celular por poço em placa de 24 poços: 5×10^5 ; macrófagos, densidade celular por poço em placa de 24 poços: 3×10^5) foram inoculadas com a mesma quantidade das diferentes estirpes de HIV (1 ng de RT

de vírus) sendo as placas incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 3 horas, na presença de 3 mg/ml de polibrene (*SIGMA*[®], USA). Após este tempo, removeu-se o inóculo e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) sem cálcio e magnésio. Por fim, procedeu-se à co-cultura com as células-alvo (microglia e astrócitos, densidade celular por poço em placas de 24 poços: 0,5 x 10⁵), mantendo-se as co-culturas a 37°C com 5% de CO₂.

As co-culturas foram mantidas durante 7 dias em 2 condições: co-cultura das células dadoras e células-alvo, e cultura de células-alvo e células dadoras separadas 42 horas após a infeção. Em ambas as condições, foram realizadas tomas ao tempo 0, 3, 5 e 7, para posterior análise de produção viral.

Para comprovar a capacidade infecciosa das diferentes estirpes de HIV, foi realizada a infeção *cis* das diferentes populações celulares (controlos positivos), assim como a cultura destas diferentes populações não-infetadas (controlo negativo).

3.3.1. Quantificação da atividade da RT

A produção viral foi quantificada recorrendo à quantificação da atividade da RT, utilizando *Lenti RT Activity Kit*, de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento é constituído por dois passos, a síntese de DNA e a quantificação de DNA. A mistura reacional contém um molde de RNA, um *primer* e um nucleótido (BrdUTP) e é adicionada à amostra a analisar. Se existir transcriptase reversa na amostra, esta irá sintetizar uma cadeia de DNA. É depois adicionado um anticorpo α -BrdU conjugado com uma fosfatase alcalina (ALP) que se liga à dupla cadeia de DNA/RNA. O produto é finalmente quantificado pela adição de um substrato colorimétrico da ALP, através de análise espectrofotométrica a 405 nm no *Infinite M200* (*TECAN, Switzerland*). A atividade da ALP será proporcional à atividade da RT.

3.3.2. Extração de DNA

Nas amostras em que não ocorreu infeção produtiva, foi realizada a técnica de *nested*-PCR. Para isso, procedeu-se à extração de DNA para compreender se teria havido integração do genoma viral no genoma celular. Para a extração do DNA, foram utilizadas colunas e reagentes incluídos no *QIAamp DNA Mini Kit* (*QIAGEN, UK*), tendo sido seguidas as instruções do fabricante. Excecionalmente, foram realizadas duas eluições de forma a otimizar a quantidade de DNA extraído.

O DNA extraído foi quantificado através da absorvância a 260nm no espectrofotómetro *NanoDropTM 1000 Spectrophotometer V3.7* (*Thermo Fisher Scientific Wilmington, DE 19810 USA*). Os valores foram controlados pela razão de absorvância 260/280nm, indicativa do grau de pureza do DNA obtido, em que a absorvância a 280 nm quantifica a presença de proteínas.

3.3.3. Amplificação da região genômica LTR de HIV-1 e HIV-2

Após a extração e quantificação do DNA das células que não apresentavam uma infecção produtiva, foi realizada a amplificação do material genético pela técnica de *nested*-PCR da região LTR do HIV, tendo sido utilizado o sistema *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix* com concentração de *primers* de 1,5µl.

Para determinar se o genoma do vírus estava integrado no genoma celular, realizou-se um primeiro PCR (*primers* externos) para amplificar a sequência de DNA entre o *LTR* do HIV e o elemento cromossomal *Alu*, que se encontra intercalado ao longo do genoma humano. Seguiu-se um segundo PCR (*primers* internos), em que a partir do produto do primeiro PCR, se amplificou uma parte da região genômica *LTR*, de maneira a aumentar a especificidade da reação. Desta forma, não só se deteta a presença da região *LTR*, como se assegura que essa região e o restante genoma proviral se encontram integrados no DNA celular.

As misturas e condições de amplificação encontram-se descritas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Primers para amplificação por PCR do LTR do HIV-1.

Primer	Localização no genoma^A (pb)	Sequência 5' - 3'
<i>Alu</i> ^E	-	tcc cag cta ctg ggg agg ctg agg
<i>1LTR1</i> ^E	516-540	agg caa gct tta ttg agg ctt aag c
<i>1LTR2</i> ^I	45-71	ctg tgg atc tac cac aca caa ggc tac
<i>1LTR3</i> ^I	411-436	gct gct tat atg tag cat ctg agg gc

A - posição na sequência genômica completa do HIV-1 HXB2 (número de acesso: K03455)

E - primer externo

I - primer interno

Tabela 4 - Condições de PCR usadas para HIV-1.

Pares de primer	Tamanho do fragmento	Mistura de reação	Condições da reação
		1º PCR	
<i>Alu</i>	-	<i>Primer F</i> (10 µM) – 1,5 µl <i>Primer R</i> (10 µM) – 1,5 µl <i>Phusion Master Mix</i> – 10 µl DNA – 7 µl	1 ciclo 94°C, 10 min 40 ciclos 94°C, 40 seg 53°C, 30 seg 72°C, 40 seg 1 ciclo 72°C, 10 min
<i>1LTR1</i>			
		2º PCR	

1LTR2	391	<i>Primer F</i> (10 µM) – 1,5 µl <i>Primer R</i> (10 µM) – 1,5 µl <i>Phusion Master Mix</i> – 10 µl DNA – 7 µl dH ₂ O – 30 µl	1 ciclo 94°C, 10 min 40 ciclos 94°C, 40 seg 53°C, 30 seg 72°C, 40 seg 1 ciclo 72°C, 10 min
1LTR3			

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1%, com adição de *Greensafe* (NZYTech, Portugal) para permitir a sua visualização sob luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi o Φ x174 RFDNA/*HaeIII* Fragments (*ThermoFisher Scientific, EUA*), permitindo comparar com o tamanho dos fragmentos de DNA presentes nas amostras. O tamanho do fragmento amplificado para o HIV-1 é de 391 pb.

4. Resultados

4.1. Ensaios de infecciosidade

Os ensaios de infecciosidade realizados tiveram como objetivo comparar a capacidade de diferentes células dadoras (linfócitos T CD4+ e macrófagos), após infeção *cis* com diferentes estirpes de HIV-1 e HIV-2, disseminarem essa infeção para as células-alvo, pertencentes a linhas celulares que mimetizam as células do sistema nervoso central (CHME-3, microglia; SGV-mm, astrócitos). Averiguámos ainda se seria necessário o contacto direto entre células dadoras e células-alvo para que ocorresse propagação da infeção.

4.1.1. Células dadoras: linfócitos T CD4+

4.1.1.1. Co-cultura células-dadoras e células-alvo durante 7 dias

Nos ensaios em que mantivemos em co-cultura as células-dadoras e as células-alvo durante 7 dias, pretendia-se averiguar se era necessário a manutenção de co-cultura para que ocorresse propagação da infeção para as células do SNC.

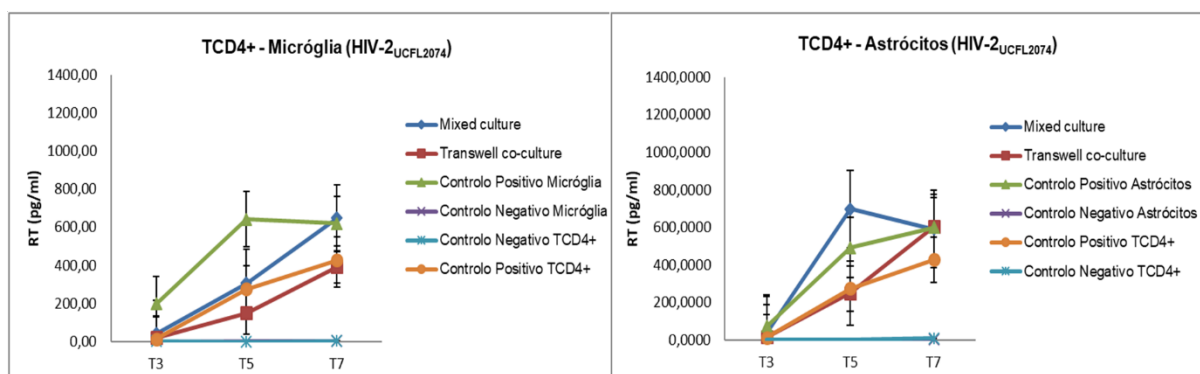


Figura 6 - Infeção *trans* de microglia e astrócitos por linfócitos T CD4+ infectados, nas condições de mixed culture e transwell co-culture.

Quando as células-dadoras e as células-alvo foram mantidas em co-cultura durante 7 dias, foi possível detectar uma maior actividade da RT na mixed-culture quando comparada com a transwell co-culture, tanto em microglia como em astrócitos infectados com a estirpe HIV-2_{UCFL2074}.

Quando comparamos a infeção *cis* das várias populações celulares, é possível perceber que a replicação viral é maior em células da microglia e astrócitos quando comparados com os linfócitos T CD4+ (controlo positivo do ensaio).

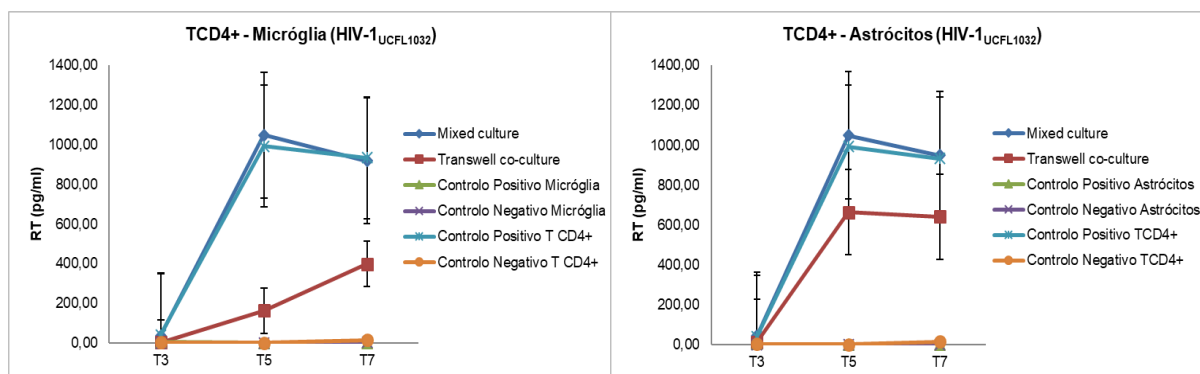


Figura 7 - Infeção *trans* de microglia e astrócitos por linfócitos T CD4+ infectados, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*.

De um modo semelhante ao ensaio com a estirpe HIV-2_{UCFL2074}, também os ensaios com a estirpe HIV-1_{UCFL1032} (figura 7), permitiram detetar uma maior atividade da RT quando as células se encontravam em *mixed culture*, comparativamente às células colocadas em *transwell co-culture*.

No entanto, e contrariamente ao que se observou na infeção com a estirpe HIV-2_{UCFL2074}, não se detetou replicação viral nas células de microglia nem nos astrócitos, quando infectados em *cis* com a estirpe HIV-1_{UCFL1032}.

4.1.2. Co-cultura de células-dadoras e células-alvo com separação 42 horas após infeção

Tendo em conta que um ciclo de replicação viral demora, em média, 24 horas a estar concluído, com a formação de novas partículas virais (89), era importante perceber se um contacto de 42 horas entre células seria o suficiente para permitir a propagação da infeção.

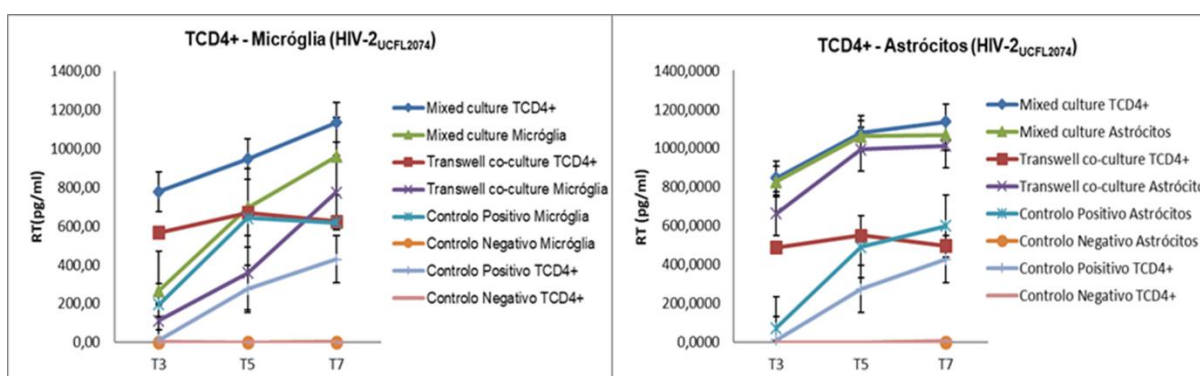


Figura 8 - Infeção *trans* de microglia e astrócitos por linfócitos T CD4+ infectados, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, com separação das diferentes populações celulares 42 horas após a infeção.

Relativamente ao ensaio com a estirpe HIV-2_{UCFL2074}, quando as células dadoras e as células-alvo foram separadas 42 horas após a infeção (figura 8), verificámos que a atividade da RT era superior nas células provenientes da *mixed culture* do que das células em *transwell co-culture*, o que parece indicar que o contacto célula-célula facilita a transmissão do HIV.

Foi também possível observar que a replicação viral nas várias populações celulares (linfócitos T CD4+, microglia e astrócitos) separadas da *mixed culture* era maior do que das mesmas células infetadas em *cis*.

Quanto às células separadas da *transwell co-culture*, observou-se também uma maior replicação viral nestas condições do que quando as células eram infetadas em *cis*. No entanto, este fenómeno só ocorreu para linfócitos T CD4+ e astrócitos, não se tendo verificado nas células de microglia.

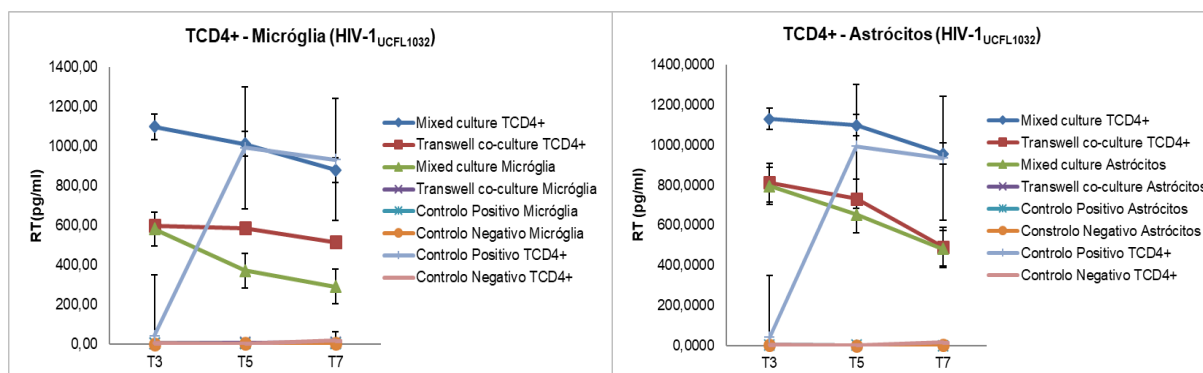


Figura 9 - Infeção *trans* de microglia e astrócitos por linfócitos T CD4+ infetados, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, com separação das diferentes populações celulares 42 horas após a infeção.

De modo semelhante ao estudo realizado com a estirpe HIV-2_{UCFL2074}, também o HIV-1_{UCFL1032} se replica mais eficientemente em linfócitos T CD4+, microglia e astrócitos separados de *mixed culture* quando comparado com as mesmas células separadas de *transwell co-culture* (figura 9).

Contudo, neste ensaio, não foi possível detetar replicação viral em microglia nem em astrócitos infetados em *cis* pelo HIV-1_{UCFL1032}. No entanto quando estas células foram mantidas em co-cultura com as células-dadoras TCD4+ e depois separadas, verificámos que existia replicação viral.

4.1.3. Células dadoras: MDM

Em ensaios anteriores, em que foram utilizadas as mesmas estirpes virais e se procedeu à infeção *cis* dos macrófagos, foi possível detetar infeção produtiva nos mesmos. No entanto, ao realizarmos os ensaios de infecciosidade em *trans*, verificámos que a infeção dos macrófagos em *cis* não ocorreu com nenhuma das estirpes testadas. Consequentemente, a ausência de um controlo positivo, impediu-nos de validar os ensaios realizados, não estando, por isso, aqui contemplados para discussão e análise.

4.2. Amplificação da região genómica LTR de HIV-1

O facto de não termos detetado replicação viral em algumas condições dos ensaios de infecciosidade, levou-nos a considerar a hipótese de que estas células funcionariam como

possíveis reservatórios virais. Como tal, averiguamos se teria ocorrido integração do genoma viral no genoma celular, tendo recorrido para isso primeiro à amplificação da região Alu-LTR, seguida da região LTR-LTR, pela técnica de *nested*-PCR. Desta forma, não só se deteta a presença da região LTR, como é assegurada que essa região (e, portanto, o resto do genoma proviral) se encontra integrada no DNA celular.

Os produtos de PCR obtidos foram visualizados sob luz ultravioleta, após integração do reagente Greensafe diretamente no gel de agarose a 1%. O marcador molecular aplicado no gel de agarose foi Φ x174 RF DNA/HaeIII Fragments (ThermoFisher Scientific, EUA) no sentido de identificar a banda correspondente ao fragmento amplificado pretendido, correspondente a 391 pb.

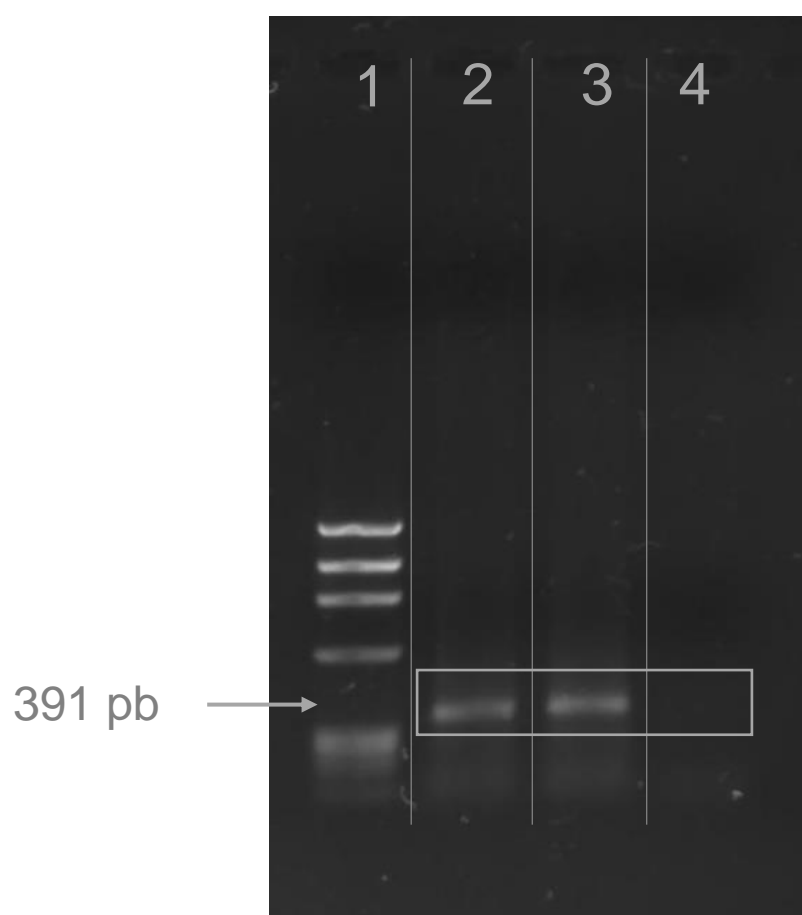


Figura 10 - Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 391 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de CHME-3 infetadas pela estirpe HIV-1_{UCFL1032}. 1 – Marcador de peso molecular (Φ x174 RFDNA/HaeIII Fragments, ThermoFisher Scientific, EUA); 2 – CHME-3 infetadas em *cis* pela estirpe HIV-1_{UCFL1032}; 3 – Controlo positivo; 4 – Controlo negativo.

Como se pode verificar na figura 10, referente à amostra do ensaio de infecciosidade em *cis* de microglia (poço 2), quando comparado com o controlo positivo é possível afirmar que a estirpe HIV-1_{UCFL1032} integrou o genoma proviral no DNA da célula-alvo com sucesso.

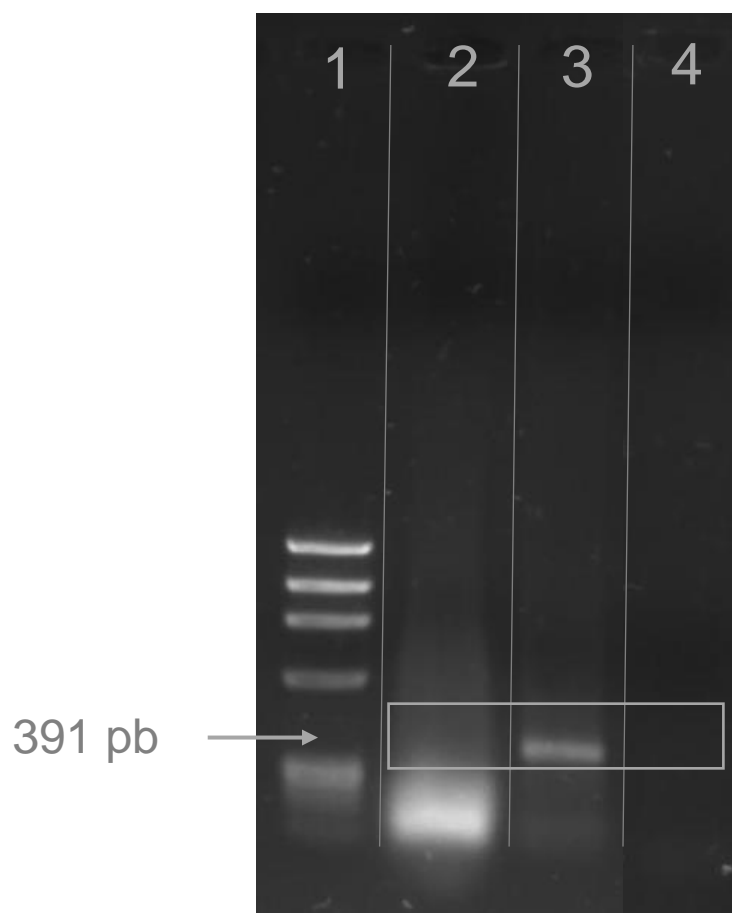


Figura 11 - Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 391 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de SGV-mm infectados pela estirpe HIV-1_{UCFL1032}. 1 – Marcador de peso molecular (Φ x174 RFDNA/*HaeIII* Fragments, ThermoFisher Scientific, EUA), 2 – SGV-mm infectadas em *cis* pela estirpe HIV-1_{UCFL1032}; 3 – Controlo positivo; 4 – Controlo negativo.

No caso do PCR realizado com DNA proveniente de astrócitos infectados em *cis* pela estirpe HIV-1_{UCFL1032} (figura 11), não foi possível amplificar o fragmento de 391 pb correspondente ao fragmento de DNA proviral. As bandas visíveis na figura 11 (poço 2) correspondem à amplificação de regiões inespecíficas.

5. Discussão

Face aos resultados obtidos, foi possível verificar que existe uma diferença significativa entre capacidade infecciosa da estirpe de HIV-2^{UCFL2074} e a de HIV-1^{UCFL1032} no que diz respeito à infeção *cis* das células do SNC, sendo claro que apenas o HIV-2^{UCFL2074} consegue infectar diretamente estas células. Tendo em conta a menor capacidade atribuída ao HIV-2 de infectar linfócitos T CD4+ (12,13), seria de esperar que algo semelhante acontecesse ao nível da infeção de microglia e astrócitos, uma vez que as células de microglia apresentam uma baixa expressão do recetor CD4+ e os astrócitos são células CD4+ negativas. Contudo, esses não foram os resultados obtidos, podendo estes demonstrar a possibilidade da existência de um mecanismo ou capacidade diferente do HIV-2 infectar diretamente outras células, nomeadamente células do SNC, quando comparado com a capacidade infecciosa do HIV-1.

No que diz respeito às condições utilizadas para compreender se a infeção das células cerebrais ocorreria mais facilmente através do contacto célula-célula, os resultados indicam que este contacto permite uma maior propagação da infeção, originando uma maior replicação viral nas células provenientes dos poços em que se tinha utilizado a *mixed culture*, comparativamente às células provenientes de *transwell co-culture*, sendo os resultados válidos para ambas as estirpes testadas.

Outro resultado importante observado nos ensaios com a estirpe HIV-2^{UCFL2074}, foram as diferenças existentes ao nível da atividade da RT entre a infeção direta das células (infeção *cis*) e a infeção em *trans* (nas condições de *mixed culture* ou de *transwell co-culture*). No primeiro caso, foi detetada uma maior replicação viral em linfócitos T CD4+, microglia e astrócitos que estiveram em *mixed culture* e foram separados 42 horas após a infeção em comparação com a infeção *cis* das mesmas células. No caso dos ensaios em que as células estiveram em *transwell co-culture* e foram separadas 42 horas após a infeção, verificou-se uma maior replicação viral em linfócitos T CD4+ e astrócitos, mas não em microglia, quando comparado com a infeção *cis* das mesmas células. Estes resultados podem levar a considerar a possibilidade da existência de fatores solúveis provenientes da co-cultura que parecem ter potenciado a infeção dos astrócitos.

Nos ensaios com a estirpe HIV-1^{UCFL1032}, em que também se separaram as células provenientes de *mixed culture* e *transwell co-culture* 42 horas após a infeção, os resultados obtidos demonstram que não ocorreu disseminação da infeção para as células-alvo separadas da *transwell co-culture*, mas que a mesma ocorreu quando foram separadas da *mixed culture*.

Estes dois resultados parecem querer indicar que as células de microglia são células que necessitam de um contacto célula-célula para que ocorra propagação da infeção nas mesmas, ao contrário dos astrócitos, que parecem ser capazes de propagar a infeção mesmo que exista uma barreira física entre a célula dadora e a célula-alvo. Estas diferenças podem querer indicar a existência de mecanismos diferentes na infeção destas linhas celulares, que podem também acontecer *in vivo*.

Relativamente aos resultados obtidos na amplificação da região genómica LTR das células em que não foi detetada replicação viral, foi possível identificar a ocorrência de integração viral nas células de micróglia infetadas em *cis* pela estirpe HIV-1_{UCFL1032}. No caso dos astrócitos onde não se detetou replicação viral, os resultados obtidos no PCR não permitem validar a existência de uma integração viral no genoma celular da célula-alvo. Tendo em conta estes resultados, foi possível considerar que as células de micróglia infetadas diretamente pela estirpe HIV-1_{UCFL1032} funcionavam como um reservatório viral, uma vez que ocorreu integração viral no genoma destas células, mas não foi detetada produção de partículas virais infecciosas.

6. Conclusão

Apesar dos constantes avanços científicos e tecnológicos ao longo dos tempos, a infeção pelo HIV permanece ainda um problema de saúde pública. Mesmo já existindo terapêuticas capazes de impedir a replicação viral, com diminuição da carga viral no sangue dos indivíduos infetados bem como o aumento da sobrevivência dos mesmos, ainda existem muitas comorbilidades associadas à infeção (60–62). Dentro dessas comorbilidades, encontram-se as doenças neurodegenerativas associadas ao HIV que podem ter implicações importantes na vida dos indivíduos infetados, não só a nível físico e psicológico, mas também ao nível social (59,60).

Um dos principais problemas que limita a capacidade das terapêuticas em diminuir a incidência deste tipo de comorbilidades prende-se com a capacidade de penetração da mesma através da BHE. Quando a penetração é baixa ou a terapêutica não atinge níveis suficientes para suprimir a replicação viral, os doentes continuam a apresentar sintomas e complicações neurológicas (64). Na terapêutica antirretroviral atual, a sua capacidade de penetração através da BHE é variável, sendo que em estadios mais avançados da doença em que existe um maior comprometimento da BHE, a penetração da terapêutica aumenta.

A neuroinvasão pelo HIV continua a ser alvo de muitos estudos, uma vez que a infeção das células do SNC, nomeadamente, de micróglia e astrócitos, é possível *in vivo* tendo já sido descrita por alguns investigadores (69,77,79). Outros estudos revelaram também uma menor utilização do recetor CD4+ pelo HIV para entrar nas células do parênquima cerebral, levando a crer numa adaptação por parte do vírus a células que apresentam menor ou nenhuma quantidade deste recetor, como é o caso da micróglia e dos astrócitos (66,67).

Tendo em conta os resultados obtidos, tanto nos ensaios de infecciosidade como nos de amplificação da região LTR, é possível tirar algumas conclusões, nomeadamente no que diz respeito às condições necessárias para que ocorresse disseminação da infeção.

Foi possível perceber que, com ambas as estirpes, a disseminação da infeção foi superior quando as células foram mantidas em co-cultura durante algum tempo, permitindo um contacto célula-célula que parece ser facilitador da passagem das partículas virais para as células-alvo. Também foi possível verificar que a estirpe HIV-2_{UCFL2074} foi capaz de infetar diretamente as células de micróglia e astrócitos, ao contrário da estirpe HIV-1_{UCFL1032}, levando a crer que os subtipos virais podem disseminar a infeção de modos diferentes. Estes resultados podem indicar uma melhor adaptação do HIV-2 à infeção fora da corrente sanguínea e do sistema linfático, com uma melhor capacidade infecciosa no microambiente do parênquima cerebral e em células que expressem pouca ou nenhuma quantidade do recetor CD4+.

O facto de termos obtido pouca ou nenhuma replicação viral em micróglia e astrócitos infetados *in cis* pela estirpe HIV-1_{UCFL1032}, mas termos obtido integração do genoma viral nas células de micróglia, pode significar que estamos perante infeções não produtivas de HIV, evidenciando a possível existência de mecanismos ainda não totalmente compreendidos

pelos quais as células de micróglia, e possivelmente também astrócitos, podem funcionar como reservatórios virais.

Apesar do empenho e investimento existentes em melhor compreender os mecanismos de infecção utilizados pelo HIV ao nível do SNC, ainda existem muitas opções a ser exploradas de modo a que seja possível minorar as necessidades dos indivíduos afetados com neurodegeneração associada ao HIV, especialmente no que diz respeito a novidades terapêuticas capazes de diminuir a propagação e replicação viral no SNC. Assim, com base nos resultados obtidos será necessário a realização de estudos adicionais que permitam avaliar aspetos não abordados nestes ensaios, nomeadamente no que diz respeito às capacidades de macrófagos infetados propagarem a infecção para células do SNC. Do mesmo modo, seria interessante testar a hipótese de reservatório viral das células de micróglia infetadas *in cis* pela estirpe HIV-1_{UCFL1032}, realizando uma co-cultura com outras células-alvo, permitindo averiguar se ocorreria propagação da infecção a partir de micróglia que não apresentava uma infecção produtiva.

7. Referências Bibliográficas

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. N Engl J Med. 1981 Dec 10 [cited 2019 Mar 31];305(24):1425–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6272109>
2. Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, et al. Severe Acquired Immunodeficiency in Male Homosexuals, Manifested by Chronic Perianal Ulcerative Herpes Simplex Lesions. N Engl J Med. 1981 Dec 10 [cited 2019 Mar 31];305(24):1439–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6272110>
3. Centers for Disease Control (CDC). Update on Kaposi's sarcoma and opportunistic infections in previously healthy persons--United States. [Internet]. Vol. 31, MMWR. Morbidity and mortality weekly report. 1982 Jun [cited 2019 Apr 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6810086>
4. Centers for Disease Control (CDC). Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. [Internet]. Vol. 31, MMWR. Morbidity and mortality weekly report. 1982 Sep [cited 2019 Apr 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6815471>
5. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science (New York, NY). 1983 May 20 [cited 2019 Apr 12];220(4599):868–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189183>
6. Popovic M, Sarngadharan M, Read E, Gallo R. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science. 1984 May 4 [cited 2019 Apr 12];224(4648):497–500. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.6200935>
7. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. Human immunodeficiency viruses. Science. 1986 May 9 [cited 2019 Apr 12];232(4751):697. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3008335>
8. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science (New York, NY). 1986 Jul 18 [cited 2019 Apr 12];233(4761):343–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2425430>
9. Vella S, Schwartländer B, Sow SP, Eholie SP, Murphy RL. The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. AIDS. 2012 Jun [cited 2019 Sep 21];26(10):1231–41. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002030-201206190-00012>
10. Williams IG, De Cock KM. The XI international conference on AIDS. Vancouver 7-12 July 1996. A review of Clinical Science Track B. Genitourin Med. 1996 Oct [cited 2019 Sep 21];72(5):365–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8976856>
11. Direção-Geral da Saúde. Norma nº029/2017: Abordagem terapêutica inicial da infeção por vírus de imunodeficiência humana de tipo 1 (VIH-1) no Adolescente e no Adulto. Normas Direção-Geral da Saúde. 2017;(029/2017):1–23. Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i018596.pdf>
12. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood' GACB (Arbeitskreis, Blood' S 'Assessment of PT by. Human Immunodeficiency Virus (HIV). Transfus Med Hemother. 2016 May [cited

- 2019 Apr 15];43(3):203–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403093>
13. Vijayan KKV, Karthigeyan KP, Tripathi SP, Hanna LE. Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Front Immunol.* 2017 [cited 2019 Apr 15];8:580. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28588579>
14. Gilbert PB, McKeague IW, Eisen G, Mullins C, Guéye-NDiaye A, Mboup S, et al. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med.* 2003 Feb 28 [cited 2019 Jun 16];22(4):573–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/sim.1342>
15. Doms RW, Reeves JD. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol.* 2002 Jun 1 [cited 2019 Jun 16];83(6):1253–65. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-83-6-1253>
16. Palacios JA, Pérez-Piñar T, Toro C, Sanz-Minguella B, Moreno V, Valencia E, et al. Long-Term Nonprogressor and Elite Controller Patients Who Control Viremia Have a Higher Percentage of Methylation in Their HIV-1 Proviral Promoters than Aviremic Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Virol.* 2012 [cited 2019 Jun 16];86(23):13081. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3497688/>
17. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol.* 2005 Dec 1 [cited 2019 Apr 15];34(4):233–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653205002374?via%3Dihub>
18. Greene WC, Matija Peterlin B, Stremlau MH. Molecular biology of HIV. In: *Sande's HIV/AIDS Medicine.* Elsevier; 2012 [cited 2019 Aug 16]. p. 25–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781455706952000031>
19. Gelderblom HR, Özel M, Hausmann EHS, Winkel T, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV), immunolocalization of structural proteins and virus-cell relation. *Micron Microsc Acta.* 1988 Jan 1 [cited 2019 Apr 15];19(1):41–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0739626088900391>
20. Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, et al. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci.* 2004 Sep 1 [cited 2019 Jun 16];9:2388–413. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353294>
21. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annu Rev Immunol.* 1999 Apr 28 [cited 2019 Apr 29];17(1):657–700. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.17.1.657>
22. Azevedo-Pereira JM, Santos-Costa Q. Os recetores das quimiocinas e a sua importância no ciclo replicativo do vírus da imunodeficiência humana: Implicações Clínicas e Terapêuticas. *Acta Med Port.* 2008 [cited 2018 Feb 4];21(5):497–504. Available from: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1634/1216>
23. Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 2 [cited 2018 Feb 4];94(18):9825–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9275210>
24. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet.* 2001 Nov [cited 2018 Jan 16];26(1–6):13–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12465460>
25. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science.* 1988;242(4882):1171–3. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2460925>
26. Freed EO. HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology*. 1998 Nov 10 [cited 2018 Feb 4];251(1):1–15. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682298993989?via%3Dihub>
 27. Puglisi JD, Tan R, Calnan BJ, Frankel a D, Williamson JR. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science* (80-). 1992;257(5066):76–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1621097>
 28. Aboul-ela F, Karn J, Varani G. The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *J Mol Biol*. 1995;253(2):313–32.
 29. Karn J. Control of human immunodeficiency virus replication by the tat, rev, nef and protease genes. *Curr Opin Immunol*. 1991;3(4):526–36.
 30. Hope TJ. Viral RNA export. *Chem Biol*. 1997 May 1 [cited 2018 Feb 4];4(5):335–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552197901241>
 31. Kerkau T, Bacik I, Bennink JR, Yewdell JW, Hünig T, Schimpl A, et al. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med*. 1997 Apr 7 [cited 2018 Feb 4];185(7):1295–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9104816>
 32. Vaishnav YN, Wong-Staal F. The biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem*. 1991;60:577–630.
 33. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Apr 16 [cited 2019 Apr 29];10(4):279–90. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2747>
 34. Tsunetsugu-Yokota Y, Muhsen M. Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission. *Front Microbiol*. 2013 [cited 2019 Jun 16];4:178. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847602>
 35. Tateno M, Gonzalez-Scarano F, Levy JA. Human immunodeficiency virus can infect CD4-negative human fibroblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jun [cited 2019 Aug 8];86(11):4287–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2786212>
 36. Zerhouni B, Nelson JAE, Saha K. Isolation of CD4-Independent Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates That Are Syncytium Inducing and Acutely Cytopathic for CD8 Lymphocytes. *J Virol*. 2004 [cited 2019 Aug 8];78(3):1243–55. Available from: <http://jvi.asm.org/>
 37. Hoffman TL, LaBranche CC, Zhang W, Canziani G, Robinson J, Chaiken I, et al. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 25 [cited 2019 Aug 12];96(11):6359–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10339592>
 38. Azevedo-Pereira J., Santos-Costa Q, Taveira N, Veríssimo F, Moniz-Pereira J. Construction and characterization of CD4-independent infectious recombinant HIV-2 molecular clones. *Virus Res*. 2003 Nov 1 [cited 2019 Sep 14];97(2):159–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016817020300248X?via%3Dihub>
 39. González-Scarano F, Martín-García J. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jan [cited 2019 Aug 28];5(1):69–81. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri1527>
 40. Lucas S, Nelson AM. HIV and the spectrum of human disease. *J Pathol*. 2015 Jan 1

- [cited 2019 Aug 12];235(2):229–41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.4449>
41. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 27 [cited 2019 Jun 16];96(9):5215–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10220446>
 42. Gabuzda D, Wang J. Chemokine receptors and mechanisms of cell death in HIV neuropathogenesis. *J Neurovirol*. 2000 May [cited 2019 Sep 19];6 Suppl 1:S24–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871762>
 43. Norkin LC. Virus receptors: implications for pathogenesis and the design of antiviral agents. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Apr [cited 2019 Jun 16];8(2):293–315. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621403>
 44. Lorenzi JCC, Lorenzi VCB, Zanette DL. Cd4 + T Lymphocytes and the Immune Response. *Scire Salut*. 2012;2(79):5–9.
 45. Bour S, Geleziunas R, Wainberg MA. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev*. 1995 Mar [cited 2019 Sep 16];59(1):63–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7708013>
 46. Klatzmann D, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, Danquet C, Vilmer E, Griscelli C, et al. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science*. 1984 Jul 6 [cited 2019 Jun 16];225(4657):59–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6328660>
 47. Kedzierska K, Crowe S. The Role of Monocytes and Macrophages in the Pathogenesis of HIV-1 Infection. *Curr Med Chem*. 2002 Nov 1 [cited 2019 Sep 18];9(21):1893–903. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369874>
 48. Cline M, Lehrer R, Territo M, Golde D. Monocytes and Macrophages: Functions and Diseases. *Ann Intern Med*. 1978 Jan 1 [cited 2019 Sep 17];88(1):78. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-88-1-78>
 49. Carter CA, Ehrlich LS. Cell Biology of HIV-1 Infection of Macrophages. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62(1):425–43.
 50. Spudich S, González-scarano F, Walker B, Mcmichael A, Wilen CB, Tilton JC, et al. HIV-1-Related Central Nervous System Disease: Current Issues in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(6):1–18. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a007120>
 51. Coleman CM, Wu L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology*. 2009 Jun 1 [cited 2019 Sep 18];6:51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486514>
 52. Castell-Rodríguez A, Piñón-Zárate G, Herrera-Enríquez M, Jarquín-Yáñez K, Medina-Solares I. Dendritic Cells: Location, Function, and Clinical Implications. In: *Biology of Myelomonocytic Cells*. InTech; 2017 [cited 2019 Sep 17]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biology-of-myelomonocytic-cells/dendritic-cells-location-function-and-clinical-implications>
 53. Manches O, Frleta D, Bhardwaj N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends Immunol*. 2014 Mar [cited 2019 Sep 18];35(3):114–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24246474>
 54. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*. 2006 Nov [cited 2019 Sep 18];6(11):859–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063186>

55. CAMERON PU, FORSUM U, TEPLER H, GRANELLI-PIPERNO A, STEINMAN RM. During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion. *Clin Exp Immunol*. 2008 Jun 28 [cited 2019 Sep 18];88(2):226–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1349271>
56. Moris A, Nobile C, Buseyne F, Porrot F, Abastado J-P, Schwartz O. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood*. 2004 Apr 1 [cited 2019 Sep 18];103(7):2648–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576049>
57. Ran X, Ao Z, Yao X. Apobec3G-Based Strategies to Defeat HIV Infection. *Curr HIV Res*. 2016 [cited 2019 Sep 18];14(3):217–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26957196>
58. Nobile C, Petit C, Moris A, Skrabal K, Abastado J-P, Mammano F, et al. Covert Human Immunodeficiency Virus Replication in Dendritic Cells and in DC-SIGN-Expressing Cells Promotes Long-Term Transmission to Lymphocytes. *J Virol*. 2005 May 1 [cited 2019 Sep 18];79(9):5386–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827153>
59. Schouten J, Cinque P, Gisslen M, Reiss P, Portegies P. HIV-1 infection and cognitive impairment in the cART era: a review. *AIDS*. 2011 Mar [cited 2019 Aug 27];25(5):561–75. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002030-201103130-00003>
60. Ghafouri M, Amini S, Khalili K, Sawaya BE. HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology*. 2006 May 19 [cited 2019 Aug 27];3(1):28. Available from: <http://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-3-28>
61. Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR, Woods SP, Ake C, Vaida F, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology*. 2010 Dec 7 [cited 2019 Jun 16];75(23):2087–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21135382>
62. Garden GA. Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia*. 2002;40(2):240–51.
63. McArthur JC, Brew BJ, Nath A. Neurological complications of HIV infection. *Lancet Neurol*. 2005 Sep [cited 2019 Jun 16];4(9):543–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16109361>
64. Clements JE, Li M, Gama L, Bullock B, Carruth LM, Mankowski JL, et al. The central nervous system is a viral reservoir in simian immunodeficiency virus–infected macaques on combined antiretroviral therapy: A model for human immunodeficiency virus patients on highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol*. 2005 Jan [cited 2019 Sep 21];11(2):180–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16036796>
65. Berger, Joseph R. The blood brain barrier in HIV infection. *Front Biosci*. 2004 [cited 2019 Sep 21];9(1–3):2680. Available from: <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1427/list.htm>
66. Chen NC, Partridge AT, Sell C, Torres C, Martín-García J. Fate of microglia during HIV-1 infection: From activation to senescence? *Glia*. 2017;65(3):431–46.
67. Rossi F, Querido B, Nimmagadda M, Cocklin S, Navas-Martín S, Martín-García J. The V1-V3 region of a brain-derived HIV-1 envelope glycoprotein determines macrophage tropism, low CD4 dependence, increased fusogenicity and altered sensitivity to entry inhibitors. *Retrovirology*. 2008 Oct 6 [cited 2019 Sep 20];5:89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18837996>
68. Zink MC, Brice AK, Kelly KM, Queen SE, Gama L, Li M, et al. Simian immunodeficiency virus-infected macaques treated with highly active antiretroviral therapy have reduced central nervous system viral replication and inflammation but persistence of viral DNA.

- J Infect Dis. 2010 Jul 1 [cited 2019 Sep 21];202(1):161–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497048>
69. Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*. 2001 Apr [cited 2019 Jun 16];410(6831):988–94. Available from: <http://www.nature.com/articles/35073667>
70. Fischer-Smith T, Croul S, Adeniyi A, Rybicka K, Morgello S, Khalili K, et al. Macrophage/microglial accumulation and proliferating cell nuclear antigen expression in the central nervous system in human immunodeficiency virus encephalopathy. *Am J Pathol*. 2004 Jun [cited 2019 Aug 28];164(6):2089–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161643>
71. Kramer-Hämmerle S, Rothenaigner I, Wolff H, Bell JE, Brack-Werner R. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res*. 2005 Aug 1 [cited 2019 Aug 28];111(2):194–213. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170205001231?via%3Dihub>
72. Rezaie P. History of Neuroscience: Mesoglia and Microglia. *IBRO Hist Neurosci*. 2007 [cited 2019 Jun 16]; Available from: <http://oro.open.ac.uk/2375/>
73. Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Functions of microglia in the central nervous system – beyond the immune response. *Neuron Glia Biol*. 2011 Feb 22 [cited 2019 Jun 16];7(1):47–53. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1740925X12000063/type/journal_article
74. Edén A, Fuchs D, Hagberg L, Nilsson S, Spudich S, Svennerholm B, et al. HIV-1 viral escape in cerebrospinal fluid of subjects on suppressive antiretroviral treatment. *J Infect Dis*. 2010 Dec 15 [cited 2019 Sep 5];202(12):1819–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050119>
75. Canestri A, Lescure F, Jaureguiberry S, Moulignier A, Amiel C, Marcelin AG, et al. Discordance Between Cerebral Spinal Fluid and Plasma HIV Replication in Patients with Neurological Symptoms Who Are Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis*. 2010 Mar 1 [cited 2019 Sep 5];50(5):773–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20100092>
76. Garden GA. Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia*. 2002 Nov 1 [cited 2019 Jun 16];40(2):240–51. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.10155>
77. Russell RA, Chojnacki J, Jones DM, Johnson E, Do T, Eggeling C, et al. Astrocytes Resist HIV-1 Fusion but Engulf Infected Macrophage Material. *Cell Rep*. 2017 [cited 2019 Jun 16];18(6):1473–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28178524>
78. Li G-H, Anderson C, Jaeger L, Do T, Major EO, Nath A. Cell-to-cell contact facilitates HIV transmission from lymphocytes to astrocytes via CXCR4. *AIDS*. 2015 Apr 24 [cited 2019 Jun 16];29(7):755–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985398>
79. Scutari R, Alteri C, Perno CF, Svicher V, Aquaro S. The Role of HIV Infection in Neurologic Injury. *Brain Sci*. 2017 Apr 6 [cited 2019 Jun 16];7(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28383502>
80. ALBRIGHT A V., STRIZKI J, HAROUSE JM, LAVI E, O'CONNOR M, GONZÁLEZ-SCARANO F. HIV-1 Infection of Cultured Human Adult Oligodendrocytes. *Virology*. 1996 Mar 1 [cited 2019 Sep 21];217(1):211–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682296901087?via%3Dihub>

81. Liu H, Xu E, Liu J, Xiong H. Oligodendrocyte Injury and Pathogenesis of HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders. *Brain Sci.* 2016 Jul 22 [cited 2019 Sep 26];6(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27455335>
82. Nuovo GJ, Becker J, Burk MW, Margiotta M, Fuhrer J, Steigbigel RT. In situ detection of PCR-amplified HIV-1 nucleic acids in lymph nodes and peripheral blood in patients with asymptomatic HIV-1 infection and advanced-stage AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994 Sep [cited 2019 Sep 21];7(9):916–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7914231>
83. Bagasra O, Lavi E, Bobroski L, Khalili K, Pestaner JP, Tawadros R, et al. Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals. *AIDS.* 1996 Jun [cited 2019 Sep 21];10(6):573–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8780811>
84. Jensen BK, Roth LM, Grinspan JB, Jordan-Sciutto KL. White matter loss and oligodendrocyte dysfunction in HIV: A consequence of the infection, the antiretroviral therapy or both? *Brain Res.* 2019 Dec 1 [cited 2019 Sep 26];1724:146397. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899319304512>
85. Ensoli F, Cafaro A, Fiorelli V, Vannelli B, Ensoli B, Thiele CJ. HIV-1 Infection of Primary Human Neuroblasts. *Virology.* 1995 Jun 20 [cited 2019 Sep 21];210(1):221–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682285713360?via%3Dihub>
86. Obregón E, Punzón C, Fernández-Cruz E, Fresno M, Muñoz-Fernández MA. HIV-1 Infection Induces Differentiation of Immature Neural Cells through Autocrine Tumor Necrosis Factor and Nitric Oxide Production. *Virology.* 1999 Sep 1 [cited 2019 Sep 21];261(2):193–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497105>
87. MIZRACHI Y, RODRIGUEZ I, SWEETNAM PM, RUBINSTEIN A, VOLSKY DJ. HIV Type 1 Infection of Human Cortical Neuronal Cells: Enhancement by Select Neuronal Growth Factors. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994 Dec [cited 2019 Sep 21];10(12):1593–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7888217>
88. Calado M, Matoso P, Santos-Costa Q, Espirito-Santo M, Machado J, Rosado L, et al. Coreceptor usage by HIV-1 and HIV-2 primary isolates: The relevance of CCR8 chemokine receptor as an alternative coreceptor. *Virology.* 2010 Dec 20 [cited 2019 Sep 29];408(2):174–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682210006082>
89. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995 Jan 12;373(6510):117–22.